

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Ubicación de secuencias genómicas de Solanum  
phureja en un mapa genético utilizando marcadores  
microsatélites.**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Bióloga, Genetista, Biotecnóloga**

**AUTOR**

**Diana Susana Martinez Corcino**

**ASESOR**

**Blga. Margarita Velasquez Reinoso**

**Lima- Perú**

**2012**

A mis padres, Julia y Julio

A mis hermanas, Patty y Anita

A mi tío "Papi", que es como un segundo padre

Porque cada uno a su manera me acompañó y apoyó en  
esta etapa tan importante de mi vida ... ahora ya concluida

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gisella, por aceptar mi participación en el proyecto del “Secuenciamiento del Genoma de la Papa” y brindarme todas las facilidades para concluir de manera exitosa el presente trabajo. A Frank Guzman, por confiar en mi persona al darme la oportunidad de participar activamente en este proyecto de gran envergadura.

A los integrantes del laboratorio de la Unidad de Genómica dirigido por la Dra. Gisella, entre ellos a Edgar, Meli, Michael, Roberto, Patricia, Julio, Manu, Mary, Yeri; por ser parte de mi segunda familia. Gracias a cada uno de Uds. por brindarme su apoyo, confianza, paciencia y amistad a lo largo de toda la etapa de ejecución y redacción de la tesis.

A la profesora Maggie, por brindarme su tiempo, apoyo y tenerme paciencia durante la ejecución de la tesis y sobretodo por la orientación durante la redacción de la presente.

A mis grandes amigos de la universidad, Vane, Clau, Manu, Mary, por sus palabras de apoyo durante los momentos difíciles que surgieron en paralelo a la ejecución de la tesis.

A Ruy, por los gratos momentos compartidos durante todos estos años, por ser una de las personas que me impulsó a aceptar esta oportunidad, por ayudarme a enfrentar mis miedos y fortalecer mi confianza.

A mi tíos, sobretodo a mi tío “papi”, por estar pendiente y disponible en todo momento. Por ser un ejemplo de que con lucha y perseverancia se puede lograr y alcanzar todo lo que uno se proponga en la vida. A mis hermanas, Patty y Anita, por brindarme muchos momentos de tranquilidad y felicidad, por convertirse en mis confidentes y darme grandes ejemplos de lucha ante las adversidades. A mi padre, por brindarme apoyo y confianza, por sus consejos y palabras de aliento que me ayudaron a seguir adelante.

Y en especial a mi mami, por ser el mejor ejemplo de mujer, madre y esposa; porque siempre fuiste, eres y serás la mejor en todo. Gracias por seguir sacrificando tus satisfacciones personales con tal de vernos realizadas. Eres el motor de mi vida y a la que siempre deberé cada uno de mis logros.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Fragmentos Polimórficos de ADN amplificado (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BC	Retrocruzamiento (Backcross)
BGI	Instituto de Genómica de Beijing (Beijing Genomics Institute)
bp	pares de bases
BSA	Análisis de marcadores agrupados segregantes (Bulk Segregant Analysis)
BSS	Blue Stop Solution
CAPS	Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)
cDNA	ADN complementario (Complementary DNA)
CIP	Centro Internacional de la Papa (Center International of Potato)
cM	centiMorgan
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetyl Trimethylammonium Bromide)
CP	Polinización cruzada (Cross Pollination)
°C	Grados centígrados
DART	Diversity Arrays Technology
DH	Dobles Haploides
DI	Línea diploide heterocigota de <i>Solanum goniocalyx</i> , parental femenino
DM	Línea doblemonoploide de <i>Solanum phureja</i> , parental masculino
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular (The European Molecular Biology Laboratory)

EST	Marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (Food and Agriculture Organization)
H <sub>0</sub>	Hipótesis Nula
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
iRDye	Colorante Infrarojo
ISSR	Inter-Secuencias Simple Repetidas (Inter-Simple Sequence Repeat)
kb	kilobases
LOD	Logaritmo de la razón de verosimilitud (Logarithm of the Odds Ratio)
mA	Miliamperio
MAS	Selección asistida por marcadores moleculares (Marker Assisted Selection)
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MINAG	Ministerio de Agricultura
ml	Mililitro
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NCBI	Centro Nacional de Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information)
NFW	Agua libre de nucleasas (Nucleases Free Water)
NGS	Tecnologías de Secuenciación (Next Generation Sequencing)
nm	Nanómetro
PBA	Análogos relacionados al citocromo P450 (P450-Based Analog)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PGSC	Consorcio de Secuenciamiento del Genoma de la Papa (Potato Genome Sequencing Consortium)
PM	Potato Markers
QTL	Locus de un caracter cuantitativo (Quantitative Trait <i>Loci</i> )
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA)
RIL	Líneas Recombinantes Endogámicas
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms)
RGL	Fragmentos de ADN de genes de resistencia (Resistance Gene Like)
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR	Repeticiones de secuencia simple (Short Single Repeat)
STM	<i>Solanum Tuberosum</i> Marker
STR	Repeticiones cortas en tándem (Short Tandem Repeat)
Ta	Temperatura de anillamiento (Annealing Temperature)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borate EDTA
UHD	Densidad Ultra Alta (Ultra High Density)
$\mu$ l	Microlitro
$\chi^2$	Chi-cuadrado

# INDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
1. La Papa	5
a) Posición Taxonómica de la Papa	6
b) Origen de la Papa	7
2. Marcadores Moleculares	9
3. Microsatélites	13
4. Mapeo Genético	15
5. Construcción del Mapa Genético	17
a) Selección de progenitores y desarrollo de la población de mapeo	19
b) Selección del marcador molecular	20
c) Análisis de ligamiento entre los marcadores	21
6. El mapeo genético en papa	25
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
1. Hipótesis	32
2. Objetivo general	32
3. Objetivos específicos	32
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
1. Material Biológico	33
2. Extracción de ADN	33

3. Cuantificación de ADN y evaluación de la calidad del ADN	34
4. Resuspensión de <i>primers</i>	34
5. Estandarización de las Condiciones de Reacción de PCR	39
6. Evaluación del polimorfismo de los marcadores microsatélites	40
7. Electroforesis	41
8. Genotipado	41
9. Construcción del Mapa Genético	42
10. Ubicación de los <i>super-scaffolds</i> en el mapa genético	48
<b>V. RESULTADOS</b>	49
1. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN	49
2. Estandarización de las Condiciones de Reacción de PCR	49
3. Evaluación del Polimorfismo en los marcadores Microsatélites	50
4. Amplificación de los Microsatélites en la Población Completa	50
5. Construcción del Mapa Genético	53
6. Ubicación de los <i>super-scaffolds</i> en el mapa genético	60
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	61
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	66
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	67
<b>IX. ANEXOS</b>	76



## RESUMEN

El genotipo doble monoploide DM1-351644 de *Solanum tuberosum* Grupo *phureja* (DM) desarrollado por la Universidad de Virginia fue secuenciado por el Consorcio de Secuenciamiento del Genoma de la Papa (PGSC) en el Instituto de Genómica de Beijing teniendo como resultado una gran cantidad de *super-scaffolds* con posición genómica desconocida.

Con el fin de contribuir a la orientación y posicionamiento de estos *super-scaffolds* se construyó un mapa genético. En este trabajo, se analizaron 100 nuevos marcadores microsatélites diseñados por el PGSC, de los cuales 37 marcadores se lograron posicionar en 12 grupos de ligamiento.

Debido a la utilización de microsatélites con posición cromosómica conocida se pudo asignar estos grupos de ligamiento a los 12 cromosomas específicos de la papa.

Con estos marcadores posicionados se pudieron ubicar 37 *super-scaffolds*, contribuyendo al conocimiento del orden de las secuencias genómicas con posición cromosómica desconocida productos del secuenciamiento del genoma de DM. El conocimiento del genoma será una herramienta importante para ser utilizada en los futuros programas de mejoramiento.

**Palabras claves:** PGSC, *super-scaffolds*, microsatélites, polimorfismo, segregación, distorsión, mapa genético

## ABSTRACT

A doubled monoploid DM1-351644 of *Solanum tuberosum* Grupo *phureja* (DM) developed by the University of Virginia was sequenced by the Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) at the Beijing Genomics Institute resulted in a lot of super-scaffolds with unknown genomic position.

In order to contribute to the orientation and positioning of these super-scaffolds, a genetic map was constructed. In this study, we analyzed 100 new microsatellite markers designed by PGSC, which 37 markers were achieved position in 12 linkage groups.

Due to the use of microsatellites with known chromosomal position, these linkage groups could be assigned to the 12 specific chromosomes of potato.

With these markers 37 super-scaffolds could be located, contributing to the knowledge of the order of genomic sequences from DM with unknown chromosomal position. The knowledge of the genome will be an important tool to be used in future breeding programs.

**Key words:** PGSC, *super-scaffolds*, microsatellite, polymorphism, segregation, distortion, genetic map

## **I. INTRODUCCIÓN**

La papa es el cuarto cultivo más importante después del arroz, trigo y maíz a nivel alimentario y económico (FAO, 2008).

En nuestro país, la Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos (OEEE) del Ministerio de Agricultura (MINAG) reportó que durante los meses de Enero y Abril del 2011 la producción de papa llegó a 1482 toneladas y que durante el año 2010 se llegó a registrar una cosecha de 289,600 hectáreas (MINAG, 2011). En Perú, los siete principales departamentos productores de papa con la mayoría de su superficie sembrada son: Puno, Huánuco, Cusco, Cajamarca, La Libertad; Junín y Ayacucho, los mismos que llegaron a producir 68% del volumen total del tubérculo de todo nuestro territorio (MINAG, 2011).

En un futuro cercano, se prevé que la población mundial aumente cerca de 100 millones de personas al año y este aumento se dará principalmente en países en desarrollo, por lo que garantizar la seguridad alimentaria se ha convertido en el nuevo reto para estos países.

En el caso de la producción de papa, en nuestro país así como en muchos otros es de autoconsumo es decir se utiliza netamente para la alimentación del productor siendo su principal fuente de nutrición, sin embargo el conocimiento de los beneficios y ventajas de este cultivo, ha incrementado el interés por entender aspectos como la reproducción, el desarrollo y la producción de los tubérculos, así como la interacción de esta planta con las plagas y las enfermedades. A través de estos estudios se ha conseguido estrategias para el mejoramiento del cultivo y contar con más opciones para garantizar la seguridad alimentaria

La introducción de marcadores moleculares permite acelerar los programas de mejoramiento genético, se simplifica el proceso de selección de variedades mejoradas con características de interés comercial y entre otros aspectos permite la construcción de mapas genéticos. En ellos se muestra la posición relativa de los genes en los cromosomas permitiendo la ubicación de los grupos de genes y/o *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, *Quantitative Trait Loci*) que puedan proporcionar resistencia a enfermedades o plagas.

Entre los marcadores más utilizados para la construcción de los mapas genéticos se encuentran los marcadores microsatélites, también llamados SSR (*Short Single Repeat*), los que presentan características idóneas para este fin, como son: el comportamiento codominante, multiallelismo, alto nivel de polimorfismo, gran distribución en el genoma y reproducibilidad de la técnica entre otros aspectos.

El conocimiento de la posición de los marcadores moleculares de tipo de secuencias de sitios etiquetados (STS, *Sequence Tagged Sites*) y microsatélites dentro de un mapa genético, permite determinar la ubicación cromosómica de secuencias genómicas relacionadas a dichos marcadores así como la de los genes ligados a ellos, pudiendo ser utilizado como referencia para los investigadores del mejoramiento genético.

A inicios del 2006 se formó el Consorcio Internacional de Secuenciamiento del Genoma de la Papa (PGSC, *Potato Genome Sequencing Consortium*), con el objetivo de elucidar la secuencia completa del ADN de la papa. Dicho Consorcio está conformado por 14 grupos de investigación de los siguientes países: Argentina, Brasil, Chile, China, Estados Unidos, India, Irlanda, Italia, Nueva Zelanda, Países Bajos, Perú, Polonia, Rusia y Reino Unido.

El PGSC empezó a secuenciar el genoma del genotipo RH89-039-16 (RH) desarrollado a partir de la papa cultivada *Solanum tuberosum* grupo *tuberosum*, utilizando una librería de cromosoma artificial bacteriano (BACs, *Bacterial Artificial Chromosome*) y un mapa genético ultradenso (UHD) basado en marcadores AFLPs (Van Os *et al.*, 2006). Sin embargo, la heterocigosidad presente en el genotipo RH complicó el proceso de secuenciamiento, por tanto se decidió trabajar con el genotipo DM1-3 516R44 (DM), un doble monoploide desarrollado a partir de otra papa cultivada: *Solanum tuberosum* grupo *Phureja*.

El genotipo doble monoploide DM1-351644 de *Solanum phureja* (DM) desarrollado por la Universidad de Virginia fue secuenciado por el PGSC en el BGI (*Beijing Genome Institute*) utilizando la tecnología ILUMINA, las secuencias resultantes fueron complementadas con secuencias obtenidas por la utilización de la Tecnología 454, resultando en 681 *super-scaffolds* con posición genómica desconocida (Guzmán *et al.*, 2010).

Un *super-scaffold* está formado por dos o más *scaffolds* conectados por 100 Ns (bases nucleotídicas no conocidas). Los *scaffolds* son porciones del genoma compuestos por *contigs* (secuencia genómica contigua en la cual el orden de las bases nucleotídicas es conocida con un alto nivel de confianza, por tanto no contiene ninguna base desconocida) y *gaps*.

A partir de los 500 *super-scaffolds* más grandes, se desarrollaron un total de 550 marcadores SSR a los cuales se les codificó como PM (*Potato Markers*), 100 marcadores microsatélites fueron asignados a la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

En el presente trabajo se analizó los 100 marcadores con el fin de orientar y posicionar estos *super-scaffolds* se construyó un mapa genético basado en los marcadores microsatélites asignados a la Unidad de Genómica de la UPCH y marcadores microsatélites mapeados anteriormente (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2008).

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. La Papa

La papa es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas, pertenece a la familia Solanaceae, al igual que el tomate (*Lycopersicum esculentum*), la berenjena (*Solanum melongena* L), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el pimiento (*Capsicum annum*) (FAO, 2008).

La papa se cultiva en diferentes tipos de clima: templado, subtropical y tropical, sin embargo la mejor producción ocurre a una temperatura promedio de 18 °C a 20 °C (FAO, 2008), por tanto, la gran capacidad para adaptarse a diversos ambientes (plasticidad) ha hecho que este cultivo sea accesible a una gran parte de la población mundial.

El centro de origen de la papa se encuentra entre la región andina del Perú y Bolivia. Es una planta anual, de tallo erecto, que puede medir hasta un metro de altura, su fruto es una baya verde, de forma semejante a la de un tomate pero de menor tamaño. La parte que se consume es el tubérculo, es decir, un engrosamiento subterráneo de los tallos que sirve para almacenar sustancias de reserva (FAO, 2008).

Aunque depende de la variedad de papa cultivada, de manera general se puede indicar que 100 g. de tubérculo aporta 87 kcal y se compone de 77 g. de agua, 20,13 g. de carbohidratos, 1,87 g. de proteínas, 13 mg. de vitamina C (Ácido ascórbico), 44 mg. de fósforo, entre otros minerales (Anexo 1).

#### a) Posición Taxonómica de la Papa

La taxonomía de la papa según NCBI (2011):

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Asteridae
Orden	:	Solanales
Familia	:	Solanaceae
Género	:	<i>Solanum</i>

La taxonomía ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años, sin embargo, existe una gran controversia acerca de la clasificación de los diferentes grupos cultivados de papa dentro de una sola especie.

Taxonómicamente, la papa está dividida en siete especies de acuerdo con la clasificación de Hawkes (1990), en nueve según Ochoa (1999) y en una sola según Huamán y Spooner (2002).

Citológicamente se han identificado 4 grupos distintos: diploide ( $2n=24$ ), al que pertenecen las variedades *ajanhui*, *stenotomum* y *phureja*; triploide ( $2n=36$ ), con variedades como *chaucha* y *juzepczuki*; tetraploide ( $2n=48$ ), donde se ubican las variedades *andigenum* y *chilotanum* y las pentaploides ( $2n=60$ ), que contienen, entre otros, a la variedad *curtilobum* (Tabla 2).



Tabla 2. Clasificación citológica y taxonómica de la papa

PLOIDÍA	HAWKES (1990)	OCHOA (1999)	HUAMÁN Y SPOONER (2002)
2x	<i>S. ajanhuiri</i>	<i>S. x ajanhuiri</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
	<i>S. stenotomum</i>	<i>S. goniocalyx</i>	Grupo ajanhuiri
	<i>S. phureja</i>	<i>S. stenotomum</i>	Grupo stenotomum
		<i>S. phureja</i>	Grupo phureja
3x	<i>S. chaucha</i>	<i>S. x chaucha</i>	Grupo chaucha
	<i>S. juzepczukii</i>	<i>S. x juzepczukii</i>	Grupo juzepczukii
4x	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i>	
	<i>Subsp. Andigenum</i>	<i>Subsp. Andigenum</i>	Grupo andigenum
	<i>Subsp. Tuberosum</i>	<i>Subsp. Tuberosum</i>	
		<i>S. hygrothermicum</i>	
5x	<i>S. curtilobum</i>	<i>S. curtilobum</i>	

Fuente: Papas nativas desafiando al cambio climático (Gutierrez, Raimundo; 2008)

Los estudios citológicos indican que la evolución de las papas cultivadas se ha iniciado a partir de especies diploides a pentaploides, es decir, las especies diploides serían las especies más primitivas y las pentaploides serían las especies más recientes según Vásquez (1988).

#### b) Origen de la Papa

En los últimos años tanto los estudios bioquímicos, genéticos y moleculares han corroborado la teoría de la existencia de un solo centro de domesticación de la papa, ubicado en la región peruana-boliviana (Hawkes, 1990; Spooner *et al.*, 2005).

Según Hawkes (1990), las primeras papas domesticadas pertenecieron a la especie diploide *Solanum stenotomum*, la cual derivó de *Solanum leptophyes*. A su vez, *S. stenotomum* probablemente se cruzó con *Solanum sparsipilum*, una especie silvestre, diploide seguida de una duplicación cromosómica lo cual daría origen a la especie cultivada tetraploide *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

Sukhotu y Hosaka (2006) plantearon a través del uso de ADN nuclear y de cloroplasto, que la subsp. *andigena* surgió del grupo *Stenotomum* a través de la poliploidización sexual además que esta subespecie al ser llevada al sur de Chile por los antiguos habitantes de los Andes se adaptó a los días largos y evolucionó a *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*.

Otras especies diploides cultivadas son:

- *Solanum phureja*, comúnmente conocida como “*papa criolla*”, la cual se habría originado por selección y eventos de mutaciones a partir de *S. stenotomum* (Hawkes, 1990), esta especie se distribuye geográficamente desde el norte de Bolivia hasta el suroeste venezolano (Sukhotu y Hosaka, 2006). *S. phureja* se caracteriza por presentar tubérculos pequeños, adaptación a días cortos, ausencia de dormancia y ploidía predominantemente diploide (Gishlain *et al.*, 2006).
- *Solanum goniocalyx*, comúnmente llamada “*papa amarilla*”, considerada como un derivado de *S. stenotomum*, presenta una alta diversidad desde el norte del Perú hasta el centro de Bolivia.

A pesar de la diversidad y la gran importancia de este cultivo, aún no se tiene conocimiento completo de la base genética de muchas de las características de interés agronómico. Es así que con ayuda de los marcadores moleculares se logrará establecer relaciones entre los caracteres de interés y los *loci* que las controlan y se permitirá el desarrollo e implementación de diversos programas de mejoramiento con el objetivo de mejorar las variedades ya existentes.

## 2. Marcadores Moleculares

Un marcador debe ser un polimorfismo genético heredable, con una interpretación inequívoca en cuanto a su segregación y una alta reproducibilidad (Liu, 1998). Tradicionalmente en los estudios de genómica se han usado 3 tipos de marcadores génicos: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores de ADN.

- 1) Marcadores morfológicos, los cuales son caracteres fenotípicos visibles.
- 2) Marcadores bioquímicos, resultan de la expresión génica de las llamadas isoenzimas o aloenzimas que son formas alternativas de una enzima.
- 3) Marcadores moleculares (o de ADN), marcadores que revelan sitios de variación en el ADN.

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aún antes de que expresen el rasgo de interés. Gracias al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación del mundo.

Los primeros marcadores utilizados en estudios genéticos fueron los marcadores morfológicos, los cuales eran representaciones de caracteres de fácil identificación visual. Estos marcadores contribuyeron significativamente en el desarrollo teórico del análisis de ligamiento génico y sirvieron para la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Sin embargo, estos caracteres pueden ser enmascarados por efectos epistáticos o pleiotrópicos, interactuando los alelos (variantes del gen) de manera dominante o recesiva dificultando la diferencia entre un individuo homocigoto de un individuo heterocigoto, por tanto el uso de estos marcadores se consideró limitado.

En la década del 60 aparecieron los marcadores bioquímicos, como las isoenzimas, las cuales son variantes de una misma enzima que presentan una función idéntica o similar entre ellas y que se encuentran presentes en un mismo individuo (Markert y Moller, 1959). Estas isoenzimas se originan por alteraciones en las secuencias de los aminoácidos causando cambios en la carga neta o en su conformación y por tanto en su movilidad electroforética, marcando de esta manera la variación alélica del *loci* de un gen estructural. Con estos marcadores se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies de organismos, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico, sin embargo su utilización es limitada por las modificaciones transcripcionales de la proteína (Staub *et al.*, 1982).

Actualmente los marcadores más usados son los marcadores moleculares, éstos representan un conjunto de herramientas para la detección de variaciones en las secuencias de ADN (Jones *et al.*, 1997). Las diferencias o variaciones pueden deberse a la adición, delección o sustitución de pares de bases, así como a los rearrreglos de los segmentos de ADN por efecto de las delecciones, inserciones, inversiones o translocaciones ocurridas en las cadenas de ADN (Paterson, 1996)

Para considerar un marcador molecular ideal debe poseer las siguientes características (Agarwal *et al.*, 2008):

- 1) Buena distribución a lo largo del genoma
- 2) Presentar alto grado de polimorfismo
- 3) Proveer una adecuada resolución de las diferencias genéticas
- 4) La técnica para analizar el marcador debe ser simple, rápida, de bajo costo y reproducibilidad
- 5) Requerimiento de pequeñas cantidades de ADN
- 6) No requerir información a priori acerca del genoma del organismo en estudio

Sin embargo, ningún marcador molecular es ideal para todos los tipos de estudios, cada tipo difiere de otro en cuanto a: la abundancia genómica, el nivel de polimorfismo detectado, la especificidad de locus, la reproducibilidad, los requerimientos técnicos y el costo (Agarwal *et al.*, 2008).

Los marcadores moleculares muestran polimorfismos a nivel de ADN, dependiendo del método usado para revelar el polimorfismo se puede dividir en 3 categorías: marcadores basados en la hibridación, marcadores basados en la amplificación del ADN y los marcadores mixtos (Agarwal *et al.*, 2008).

Los marcadores basados en la Hibridación detectan un segmento específico del ADN a través de la hibridación entre un fragmento marcado (sonda) y su secuencia complementaria presente en el genoma del individuo en estudio. Dentro de este grupo se consideran a los marcadores de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

Los RFLPs son segmentos obtenidos a partir de la digestión enzimática del ADN en estudio, luego se procede a la separación por electroforesis en gel de agarosa, para luego iniciar la transformación de fragmentos por *Southern Blot* seguido de la hibridación con sondas radioactivas o fluorescentes, y finalmente son visualizados por tinción con bromuro de etidio. Los RFLPs fueron desarrollados inicialmente para su uso en la producción de mapas genéticos en los seres humanos (Botstein *et al.*, 1980), también fueron utilizados para evaluar diversidad genética (Helentjaris *et al.*, 1985) y para el desarrollo de mapas genéticos en plantas (Helentjaris *et al.*, 1986). Sin embargo, entre las desventajas de este marcador se encuentra la necesidad de disponer de sondas para la especie en estudio elevando el costo de la técnica (Paterson, 1996).

Los métodos basados en la amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consisten en la producción de numerosas copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa y algunos reactivos como los oligonucleótidos llamados cebadores (*primers*) que son diseñados artificialmente para que complementen la secuencia de ADN que delimitará, la cual será el blanco de la amplificación. Algunos de estos métodos basados en la Reacción en Cadena la Polimerasa son los RAPD, AFLPs y SSR.

RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) es una técnica de amplificación arbitraria por PCR para encontrar polimorfismos, usando un *primer* decámero con una secuencia arbitraria, donde el polimorfismo es revelado a través de presencia o ausencia de productos amplificados. Se introdujeron en 1990 (Williams *et al.*, 1990) como una forma rápida de detectar marcadores genéticos que pudieran ser fácilmente mapeados. Los RAPDs son marcadores dominantes, por tanto no permiten discriminar entre individuos heterocigotos y homocigotos y a diferencia de los RFLPs son mucho más rápidos, fáciles y baratos, sin embargo los RAPDs no son reproducibles (Staub *et al.*, 1996).

Entre los marcadores mixtos se debe mencionar a los marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), en esta técnica se combina el uso de enzimas de restricción (similar al RFLP) y la amplificación por PCR de fragmentos selectivos. Al principio el ADN es doblemente digerido por dos enzimas de restricción: una de corte raro (ej: *PstI*), la cual produce bajo número de fragmentos; y una de corte frecuente (ej: *MseI*), que produce una gran cantidad de fragmentos. Luego se usan adaptadores que son ligados a ambos extremos de estos fragmentos, actuando como sitios de unión para los *primers*, diseñados para la amplificación por PCR (Vos *et al.*, 1995).

Al igual que los RAPDs, los AFLPs son marcadores dominantes, se introdujeron como una novedosa técnica para el análisis de la huella genética de ADN más conocido como *fingerprinting* y se usaron rápidamente en la cartografía de plantas. Los AFLPs tienen entre sus ventajas el uso de mínimas cantidades de ADN y generar una gran cantidad de datos (generalmente de 100 a 200 bandas por marcador) sin embargo el ADN a usar debe ser de alta calidad convirtiéndose en una técnica muy exigente además de ser costosa.

### 3. Microsatélites

Los microsatélites o SSR (*Short Sequence Repeat*) fueron reportados por primera vez en 1989 como un sistema de marcadores en combinación con el PCR. Los microsatélites son repeticiones en tándem –desde 2 hasta 30 veces– de secuencias de 2 a 8 nucleótidos, por ejemplo: (TA)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub>, (TTCC)<sub>n</sub> (Bruford y Wayne, 1993).

Los microsatélites pueden ser agrupados en cuatro clases:

- a) Microsatélites perfectos: la secuencia de repetición no es interrumpida por ninguna base no perteneciente al motivo de repetición, por ejemplo:  
CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
- b) Microsatélites imperfectos: en este tipo hay un par de bases entre el motivo de repetición, por ejemplo: CTCTCTCTCTCTCTCACTCTCT
- c) Microsatélite interrumpido: microsatélites con un pequeño reemplazo de pares de base que no se ajustan a la estructura de la repetición, por ejemplo:  
CTCTCTCTCTCTCTGGGACTCTCTCTCT
- d) Microsatélites compuestos: consiste de 2 o más repeticiones diferentes en tándem siguientes de la otra, por ejemplo: CTCTCTCTCTCTGTGTGTGTGTGT

Los microsatélites presentan una serie de características que los han convertido en los marcadores de preferencia para el mapeo genético:

- a) Son numerosos y se distribuyen a lo largo de todo el genoma, se ha estimado que la frecuencia de presencia de los SSR en plantas es de 1 SSR por cada 6-7 kb, (Powell *et al.*, 1996).
- b) Presentan herencia mendeliana como marcadores codominantes, facilitando el seguimiento de su transmisión dentro de las poblaciones de mapeo.
- c) La mayoría de los *loci* microsatélite tienen un tamaño relativamente pequeño que facilita su caracterización vía PCR.
- d) Son transferibles entre linajes y/o especies próximas (Young *et al.*, 1998), especialmente cuando el locus microsatélite se encuentra dentro de una secuencia génica (Nagy *et al.*, 2007).
- e) Útiles para estudios de genómica comparada, ya que los microsatélites al ser transferibles se convierten en puntos de anclaje para identificar cromosomas homólogos entre especies próximas (McConnell *et al.*, 2000) o respecto a especies modelo bien conocidas a nivel genómico (Stemshorn *et al.*, 2005).

A pesar de las características favorables que presentan estos marcadores, algunos puntos limitantes para el uso de los microsatélites están relacionados a la complejidad y al elevado costo del proceso de desarrollo y obtención de las secuencias microsatélites, sobretudo cuando el objetivo es la detección de QTLs, para lo cual se necesitan mapas densos contruidos a partir de cientos de marcadores que cubran adecuadamente el genoma del individuo en estudio.

En los últimos años se han incrementado los proyectos de mapeo, por tanto se requiere integrar estrategias que combinen diversos tipos de marcadores como los microsatélites, AFLP entre otros, logrando incrementar el número de marcadores que cubran adecuadamente el genoma del individuo en estudio



#### 4. Mapeo Genético

El mapeo genético está basado sobre el principio que los genes (marcadores o *loci*) segregan a través de la recombinación de los cromosomas durante la meiosis (reproducción sexual), lo cual permite su análisis en la descendencia (Paterson, 1996).

En 1865, Mendel postuló la existencia de factores que controlan la manifestación de determinadas características fenotípicas, estos factores son conocidos actualmente como genes. Al cruzar plantas puras y contrastantes para el color de las semillas, Mendel concluyó que las plantas heterocigóticas (F1) producían dos gametos distintos a la de los gametos parentales en la misma proporción y que ambos segregaban durante la formación de los cigotos. En este caso,  $\frac{1}{4}$  de los individuos de la generación F2 es igual al fenotipo de uno de los progenitores,  $\frac{1}{2}$  de los individuos son iguales a la generación F1 y  $\frac{1}{4}$  es igual al otro progenitor, dando origen a lo que actualmente se conoce como la Primera Ley de Mendel.

Mendel continuó con sus experimentos descubriendo que la forma y el color de la semilla eran heredadas en conjunto, concluyendo que cada progenitor poseía dos copias de un gen y que éstos transmitían cada una de las copias a sus descendientes de forma independiente. De ese modo, elaboró la Segunda Ley de la Herencia conocida como la Ley de la Segregación Independiente, la cual postula que durante la formación de los gametos, la segregación de un par de genes ocurre de forma independiente del otro par.

Bateson *et al.*, (1904) demostraron que las segregaciones de los caracteres tanto de color de la flor y de la forma del polen no ocurrían de forma independiente, es decir observaron desvíos de la Segunda Ley de Mendel.

A inicios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan y colaboradores descubrieron el

ligamiento del locus *white* de *Drosophila* al cromosoma X, poco después, los mismos identificaron nuevos mutantes, entre ellos otro llamado *rudimentary* que también mostraba ligamiento al cromosoma X, motivándolo así a estudiar la segregación simultánea de estos dos genes: si siempre se heredan juntos se sugeriría que están cerca en el mismo cromosoma debido a que no se daba la recombinación entre ellos.

Morgan comprobó que podía ocurrir recombinación entre el locus *white* y el locus *rudimentary* en *Drosophila*, pero al estudiar otras mutaciones (especialmente el color amarillo del cuerpo y el color blanco de los ojos) observó que nunca se detectaba recombinación con otros *loci* localizados en el mismo cromosoma llamando ligamiento a ese fenómeno, por tanto, cuando dos genes están juntos y no segregan de manera independiente se dice que están ligados.

En 1913, A.H. Sturtevant demostró que la probabilidad de que se produzca una recombinación entre dos *loci* depende de la distancia física que los separa, y por tanto la frecuencia con que aparecen estos recombinantes podía utilizarse para deducir la distancia que separa a dos genes que están en el mismo cromosoma. De esta manera, Sturtevant construyó el primer mapa genético de ligamiento, en el que se representa el orden y la distancia de cinco genes localizados en el cromosoma X de *Drosophila*. A partir de ese momento, los trabajos relacionados con la construcción de mapas genéticos se intensificaron en una variedad de estudios y de especies.

Los primeros mapas estuvieron basados en marcadores citológicos y morfológicos, los estudios realizados con marcadores morfológicos contribuyeron en la elucidación del fundamento teórico del análisis de ligamiento génico y para la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Knapp, 1991), siendo útiles en los casos en que los grupos de ligamiento ya estaban asociados a determinados cromosomas, facilitando el anclaje de los grupos de ligamiento basados en marcadores moleculares

a cromosomas específicos (Carneiro y Vieira, 2003). Sin embargo, el uso de estos primeros mapas fue bastante restringido en programas de mejoramiento de plantas, debido al bajo número de genes marcadores que estaban disponibles para la mayoría de especies de interés ya que mapas relativamente completos sólo habían sido contruidos para especies genéticamente muy bien estudiadas como el caso del maíz (Carneiro y Vieira, 2003).

A inicios de la década del 60, se empezaron a utilizar las isoenzimas como marcadores bioquímicos (Lewontin y Hubby, 1966), permitiendo así la construcción de diversos mapas genéticos. La propiedad más expresiva de las isoenzimas como marcadores genéticos es la herencia mendeliana simple con codominancia entre alelos en la mayoría de los locus. Sin embargo, las isoenzimas presentan limitaciones como: la reducida cobertura de los genomas que son analizados en función del bajo número de *loci* que pueden ser identificado por locus.

Fue entonces que a partir de la década del 80, con el surgimiento de las técnicas del análisis molecular a nivel del ADN, aumentó el número de marcadores disponibles para la construcción de una mayor cantidad de mapas genéticos para un mayor número de especies.

## 5. Construcción del Mapa Genético

El desarrollo de los marcadores moleculares ha permitido la generación de los mapas genéticos en numerosas especies. Los mapas genéticos, conocidos también como mapas de ligamiento, consisten en la determinación de la posición y de las distancias relativas entre los marcadores a lo largo de los cromosomas.

El fundamento del mapeo genético reside en la relación directa entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los *loci*, por tanto determinando la frecuencia

de recombinación entre dos genes, uno puede estimar la distancia de mapa entre los mismos.

Mientras los genes estén localizados en cromosomas diferentes segregan de manera independiente (no ligados). Por otro lado, si dos o más genes o marcadores son heredados de manera asociada y no segregan en la progenie de manera independiente, se encontrarían ligados, es decir ubicados en el mismo cromosoma o grupo de ligamiento (Morton, 1995).

Cuando ambos *loci* ubicados en el mismo cromosoma están suficientemente alejados (Figura 1.a), existe una probabilidad tan alta de que haya un sobrecruzamiento entre ellos que segregarán de manera similar a una segregación independiente, produciendo 50% gametos de tipo parental (AB y ab) y 50% gametos de tipo recombinantes (Ab y aB).

Sin embargo, a medida que dos *loci* se sitúan más cerca uno del otro (Figura 1.b), la probabilidad de que haya un sobrecruzamiento entre ellos es cada vez menor, y por tanto la probabilidad de formación de gametos recombinantes también va decreciendo. ( $0\% < \text{Recombinante} < 50\%$ ).

Puede llegarse a un punto en que los *loci* estén tan juntos que nunca se dé un sobrecruzamiento entre ellos (Figura 1.c), de modo que no se originarán gametos recombinantes y no se encontrarán individuos recombinantes en la descendencia (0% gametos de tipo recombinante).

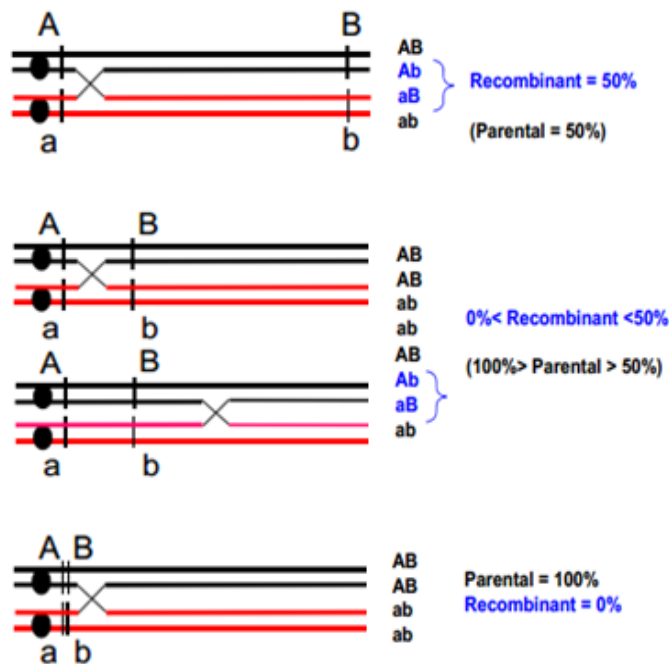


Figura 1. Frecuencia de recombinación y la distancia entre los *loci*:

- a) *loci* muy lejanos, se producirán gametos parentales (50%) y gametos recombinantes (50%)
- b) distancia intermedia entre *loci*, frecuencia de gametos parentales siempre menor al 50%.
- c) *loci* estrechamente ubicados, no se producirán gametos recombinantes (0%).

Por tanto, existe una relación directa entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los *loci*: mientras más cerca se sitúen dos marcadores en el cromosoma, menor será la frecuencia de recombinación entre ellos.

Para construir un mapa genético, es necesario tener en cuenta los siguientes puntos:

- a) Selección de progenitores y desarrollo de la población de mapeo
  - b) Selección del marcador molecular
  - c) Análisis de ligamiento entre los marcadores
- a) Selección de progenitores y desarrollo de la población de mapeo
- La selección de los progenitores es un punto importante pues los parentales deben ser genéticamente divergentes para observar claramente diferencias genéticas para uno o más caracteres de interés, no obstante los parentales no deben ser demasiado distantes genéticamente, pues podría existir problemas como:
- ✓ Esterilidad entre la progenie
  - ✓ Presencia de altos niveles de distorsión de segregación durante el análisis de

## ligamiento

Según Staub *et al.*, (1996) entre genomas distantes se puede dar la supresión de la recombinación y por ende la aparición de alelos deletéreos que pueden provocar distorsiones de las proporciones mendelianas esperadas en la descendencia, afectando de esta manera, el cálculo de la distancia y el orden de los marcadores en los grupos de ligamiento.

Para desarrollar estos mapas es esencial producir la población de mapeo, a través de los cruces entre parentales que tengan alelos diferentes entre dos o más *loci*, para poder estudiar el patrón de segregación en la descendencia, es por esto que los mapas de ligamiento dependen enormemente de la disponibilidad de polimorfismos (existencia de 2 o más alelos en un locus dado).

En cuanto a la población de mapeo, las poblaciones de líneas recombinantes endogámicas (RIL), líneas isogénicas cercanas (NILs) son poblaciones permanentes porque son líneas homocigotas que pueden ser multiplicadas por semilla y reproducibles sin que ocurran cambios genéticos (Semagn *et al.*, 2006). Sin embargo, las poblaciones más sencillas de generar son las poblaciones de tipo retrocruce (BC o *backcrossing*) y de segunda generación (Filial 2 o F2) ya que se requiere de poco tiempo para desarrollarlas en la mayoría de las especies cultivadas.

La selección de la población de mapeo dependerá específicamente del objetivo del proyecto, disponibilidad de tiempo para desarrollar la población y del tipo de marcador(es) molecular(es) a usar.

### b) Selección del marcador molecular

Varios tipos de marcadores pueden ser utilizados en la construcción de mapas,

difiendo en algunos aspectos como: número de *loci* que puede ser detectado, grado de polimorfismo, bajo costo, dificultad en la ejecución del sistema seleccionado.

La utilidad del marcador está determinada por el modo de herencia, siendo más útiles los marcadores de naturaleza codominante pues permiten discernir alelos de un locus, es decir, permiten distinguir entre los individuos heterocigotos y los homocigotos, es por esto que ha aumentado el uso de este tipo de marcadores, dentro de este tipo se encuentran los marcadores microsatélites.

Una vez identificados los marcadores polimórficos, éstos deben ser usados para genotipar la población entera. La data generada debe ser cuidadosamente revisada de errores comunes como el error tipográfico, datos perdidos (*missing data*), error de codificación del genotipo, etc. Los marcadores que presentan demasiado *missing data* contribuyen con muy poca información durante los cálculos del mapa y de hecho causan problemas.

En un estudio realizado por Hackett y Broadfoot (2003), con el fin de investigar el efecto del error de tipeo vs el *missing data* durante la construcción de los mapas de ligamiento, se demostró que el *missing data* tiene un efecto menor sobre el error de tipeo, pues este último redujo el número de marcadores ordenados correctamente y produjeron mapas con longitudes más cortas y marcadores más separados.

#### c) Análisis de ligamiento entre los marcadores

##### - Evaluación de la distorsión de segregación

Una vez identificados los marcadores polimórficos, se procede al análisis de los patrones de segregación *loci* por *loci*. El análisis de un *loci* involucra: la estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas; el cálculo de la segregación teórica y la observada, la diferencia entre ellas y la detección de la distorsión de la segregación. El

propósito de este análisis es determinar si los datos observados son como los esperados de acuerdo a un modelo genético de un *loci* simple (Liu, 1997).

Se espera un patrón mendeliano típico para cada *loci*, por tanto la ausencia del patrón mendeliano es considerado como la ocurrencia de la distorsión de la segregación mendeliana, siendo causada por factores como: errores de genotipaje y errores de escoreo (Plomion *et al.*, 1995), mientras que entre las razones biológicas se encuentran la pérdida de un cromosoma, competencia entre los gametos por la fertilización preferencial, incompatibilidad de genes, arreglos cromosómicos, etc. (Semagn *et al.*, 2006). El criterio más inmediato de verificación de la distorsión de segregación mendeliana es el test de  $\chi^2$  (Chi-cuadrado), cuya hipótesis ( $H_0$ ) no admite la aparición de distorsiones.

Según Liu (1997), los *loci* que presentan distorsión mendeliana afectan los test estadísticos usados para detectar el ligamiento, pudiendo generar falsos positivos. Por lo tanto, es recomendable el descarte de éstos para no comprometer la calidad del mapa.

#### - Establecimiento de los grupos de ligamiento

Luego de identificar y descartar aquellos marcadores que no cumplen con la segregación mendeliana esperada, se procede a analizar la existencia de ligamiento entre cada dos marcadores. Mientras mayor es la distancia entre dos marcadores, mayor es la probabilidad de ocurrencia de recombinación entre los *loci*, por tanto la frecuencia de recombinación puede ser utilizada como una medida de las distancia entre los genes.

Para calcular la frecuencia de recombinación ( $r$ ) entre dos marcadores se utiliza el método de máxima verosimilitud (Lander *et al.*, 1987). El valor de recombinación



resultante se evalúa frente a la hipótesis nula de no asociación ( $r=0,5$ ) a fin de determinar si existe ligamiento entre el par de marcadores. En los análisis de ligamiento actuales, el test de asociación se resuelve usando el Método *Lod Score* (LOD), es decir el logaritmo en base 10 de la razón entre el valor de la función de máxima verosimilitud para  $r$  y el valor de la función para segregación independiente (no ligamiento) (Morton, 1995).

Para los pares de marcadores con un valor por encima del valor crítico del LOD se rechazará la hipótesis nula y se considerará que los marcadores están ligados, mientras que aquellos con un valor menor al LOD crítico se determinarán que están no ligados.

- Determinando el orden de los *loci* y la distancia de mapa

Con el análisis de dos puntos, sólo se considera el análisis de segregación de cada dos *loci*, sin embargo este análisis no puede indicar si un marcador se localiza a la “derecha” o a la “izquierda” del otro marcador, con el fin de ubicar correctamente estos marcadores, se opta por el análisis multipunto, para esto se hace uso de algoritmos incluidos en los programas, permitiendo así estimar la frecuencia de recombinación multilocus entre los marcadores seleccionados así como la determinación del orden más probable de los marcadores dentro de un grupo de ligamiento.

Las distancias genéticas entre los marcadores ligados son calculadas a través de la frecuencia de recombinación. Aunque la frecuencia de recombinación indique la medida de la distancia entre dos *loci* a lo largo de determinado cromosoma, lo ideal es que las distancias usadas en la construcción de mapas genéticos sean totalmente aditivas, de modo que al atribuir nuevos *loci* (marcadores) al mapa, no sea necesario ajustar las distancias ya establecidas.

Sin embargo, debido al fenómeno de interferencia cromosómica (efecto en el cual la ocurrencia de un entrecruzamiento en una cierta región reduce la probabilidad de un entrecruzamiento en una región adyacente) se hace necesario el uso de las funciones de mapeo (Staub *et al.*, 1996). Estas funciones de mapeo son utilizadas para convertir las frecuencias de recombinación en unidades de mapa (cM=centiMorgan), es decir en medidas de distancia para el ordenamiento de los *loci* (Schuster y Cruz, 2004).

La función de *Haldane* asume que la ocurrencia de los intercambios génicos en segmentos adyacentes son independientes (sin interferencia), mientras que la función de *Kosambi* considera la ocurrencia de la interferencia.

Debido a la interferencia, la conversión de fracciones de recombinación a distancias genéticas mediante la fórmula de *Haldane* será mayor que las distancias de mapeo calculadas por la de *Kosambi*. Sin embargo, para frecuencias de recombinación (inferior a 20%), ambas funciones de mapeo representan valores similares a los de la frecuencia de recombinación (Schuster y Cruz, 2004).

Finalmente, un punto importante a considerar es que no existe correlación entre la distancia física (número de pares de bases) y la distancia de mapa, es decir, existen regiones cromosómicas de apenas algunos decenas de millares de pares de bases (distancia física pequeña) en que la probabilidad de recombinación es alta (regiones *hotspots*). Al mismo tiempo, hay regiones de algunos millones de pares de bases (distancia física grande) donde la recombinación es prácticamente suprimida y la distancia entre los *loci*, regiones centroméricas y teloméricas (Tanksley *et al.*, 1992; Ferreira y Gratapaglia, 1996).

Los mapas de ligamiento tienen como base el análisis de segregación de cientos de marcadores siendo necesario que este proceso sea computarizado, por tanto

programas como “*Mapmaker*” (Lander *et al.*, 1987), “*JoinMap*” (Stam, 1993) entre otros, fueron desarrollados para ayudar en el análisis genético de los datos.

## 6. El mapeo genético en papa

A partir de la década de los 80 el desarrollo de los marcadores de ADN permitió la construcción de mapas de ligamiento para la mayoría de especies vegetales de interés agronómico como la papa.

En 1988, Bonierbale *et al.*, construyeron el primer mapa de ligamiento genético de papa desarrollado en una población de mapeo producto del cruzamiento interespecífico entre *S. phureja* y un híbrido de *S. tuberosum* X *S. chacoense*. En este mapa se llegó a localizar 135 marcadores RFLPs en 12 grupos de ligamiento cubriendo sólo 606 cM del genoma de la papa, estos marcadores AFLP fueron desarrollados previamente para ser trabajados en tomate. El trabajo con los AFLP, reveló que los genomas de la papa y el tomate son colineares, reportándose que entre ambas especies nueve cromosomas (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11 y 12) parecían no haber sido alterados por ningún rearreglo cromosómico, y que los únicos cambios cromosómicos detectables fueron las inversiones paracéntricas tomando como referencia el mapa de ligamiento de *Solanum lycopersicum* (tomate).

Un año después, Gebhardt *et al.*, (1989) reportaron un segundo mapa de ligamiento para papa en una población de retrocruce de *Solanum tuberosum*. Este mapa está basado en marcadores RFLP utilizando sondas de ADN genómico y cDNAs (ADN complementario) tales como los genes PAL, Rubisco, CoA ligasa y glutamina sintetasa, en este mapa se posicionaron 141 *loci* cubriendo 690 cM del genoma de *S. tuberosum*.

Tanksley *et al.*, 1992, elaboraron un mapa denso de ligamiento (constituidos por más de 1000 marcadores RFLP) tanto para papa como para tomate. En el caso de la papa la población de mapeo fue producto de un retrocruce de *S. tuberosum* x F1 (*S. tuberosum* x *S. berthaultii*) y en el caso del tomate, la población de mapeo fue producto del cruce interespecífico *Lycopersicon esculentum* cv VF36-Tm2a x *Lycopersicon pennellii* LA7 16.

Los mapas desarrollados para ambas especies se basaron en la utilización de un conjunto común de sondas, por lo que fue posible encontrar las diferencias y las similitudes entre ambos genomas a nivel de sus cromosomas, y es que a través de esta comparación se pudo determinar puntos de quiebre correspondientes a cinco inversiones cromosómicas que permitieron diferenciar ambos genomas, cuatro de estas inversiones involucran el brazo corto de los cromosomas 5, 9, 11 y 12 y la inversión restante estaba presente en el brazo largo del cromosoma 10. En este caso se indica que debido al uso del retrocruce entre un híbrido interespecífico (*S. tuberosum* x *S. berthaultii*) x *S. tuberosum*, el tamaño del mapa se consideró pequeño (684 cM).

Jacobs *et al.*, (1995) construyeron un mapa genético en una población compuesta por 68 individuos de *Solanum tuberosum*, productos de un retrocruzamiento. En este trabajo se propuso un método diferente para la construcción del mapa: primero se realizó la construcción de mapas para cada uno de los parentales resultando el mapa del parental femenino con 132 marcadores mientras que el del parental masculino contenía 138 marcadores. Luego se integraron ambos mapas basándose en aquellos marcadores comunes, resultando un mapa combinado de 175 marcadores moleculares, 10 marcadores morfológicos y 8 marcadores de tipo isoenzimas, que cubren 1120 cM del genoma. De los marcadores moleculares, 92 fueron derivados de

secuencias de ADN flanqueantes de los insertos de T-DNA en papa así como de elementos transponibles de maíz originados a partir de estos constructos T-DNA. En este trabajo se reportó distorsión en la segregación de los RAPDs, siendo una de las posibles razones la falta de especificidad entre el cebador y el ADN genómico durante el PCR.

Van Eck *et al.*, (1995), identificaron 264 productos de amplificación de AFLP a partir de 6 combinaciones de cebadores en una población diploide de 68 individuos resultante del retrocruce entre 2 parentales no consanguíneos: USW5337.3 (como parental femenino) x 77.2102.37 (como parental masculino, producto del cruzamiento entre los genotipos VH<sup>3</sup>4211 y USW5337.3). Estos productos de AFLP fueron cartografiados utilizando 217 marcadores previamente cartografiados (es decir, de posición conocida): RFLP, isoenzimas y marcadores morfológicos.

El tamaño del mapa incrementó sólo un 5% (de 1120 cM a 1170 cM) a partir del mapa reportado previamente por Jacobs *et al.*, (1995). Este resultado indica que no existe una gran diferencia en cuanto a la cobertura de las regiones del genoma entre los marcadores RFLP y AFLP, por lo cual se empezó a considerar al AFLP como un sistema de marcadores útil en la construcción de los mapas.

En 1998, Milbourne *et al.*, desarrollaron 112 *primers* para microsatélites denominados STM (*Solanum tuberosum* microsatellite) utilizando datos del EMBL-bank y de librerías enriquecidas para microsatélites. A partir de 65 pares de *primers* se obtuvieron 89 *loci*, los cuales fueron posicionados en dos mapas de ligamiento genético de dos poblaciones de mapeo distintas. Al mapa de la población MPI de *Solanum tuberosum* (Gebhardt *et al.*, 1991) se incorporaron 47 *loci* de SSR y en la población Germicopa (no cartografiada anteriormente) se posicionaron 65 *loci*, 23 de estos *loci* fueron comunes permitiendo asignar la posición cromosómica más precisa. No hubo un

incremento en cuanto a la cobertura con los microsatélites pues se obtuvo un mapa de 879 cM para la población MPI, siendo 1050 cM el tamaño del mapa reportado previamente (Gebhardt *et al.*, 1994) en la misma población, sin embargo estos marcadores microsatélites se posicionaron en las zonas terminales de los cromosomas (zonas no cubiertas anteriormente).

En el año 2005, Yamanaka *et al.*, construyeron un mapa para una población diploide de *Solanum tuberosum* de 152 individuos, en el cual se posicionaron diversos tipos de marcadores encontrados hasta esa fecha: 111 SSR, 33 RFLP, 87 RFLP-STS, 45 CAPS (Polimorfismo de Fragmento Amplificado y Digerido), 94 RAPD, 9 AFLP, 3 RGL (Fragmentos de ADN de genes de resistencia), 4 ISSR (Marcadores moleculares Inter-Microsatélite) y 15 marcadores llamados PBA (análogos relacionados al citocromo P450).

Los PBAs fueron distribuidos en al menos 8 cromosomas, sugiriendo que tienen un potencial significativo para su uso en la construcción de mapas genéticos y como herramienta para evaluar diversidad genética. Para integrar estos marcadores en mapas genéticos ya existentes, se realizó un análisis comparativo entre mapas representativos (basados en marcadores RFLP y SSR) y el mapa basado en BSA (Análisis de Marcadores Segregantes). Con este trabajo, se pudo comprobar la posibilidad de integrar marcadores antes mapeados en diferentes tipos de poblaciones.

Ese mismo año (2005), Feingold *et al.*, contribuyeron con la introducción de 57 nuevos marcadores microsatélites (derivados de una base de datos de EST (*Expressed Sequence Tagged* de papa del TIGR *Potato Gene Index*) en mapas de ligamiento de *Solanum tuberosum*. Con esto se logró un incremento del 50% de nuevos microsatélites disponibles a lo reportado por Milbourne *et al.* (1998).

Los mapas de ligamiento hasta ese momento, fueron contruidos con un número limitado de marcadores. Van Os *et al.*, (2006) contruyeron el primer mapa genético ultradenso (UHD, *Ultra High Density Map*) en una población de 130 individuos diploides derivados del cruce de parientes de la especie *Solanum tuberosum*: SH83-92-488 x RH89-039-16, este mapa fue contruido en base a 10 000 marcadores AFLP, los cuales fueron ordenados en base a bins (un bin es una posición en el mapa genético con un único patrón de segregación y es separado del bin adyacentes por un sólo evento de recombinación).

En el 2008, Gishlain *et al.*, cartografiaron 25 nuevos microsatélites, éstos fueron desarrollados en el CIP usando el banco de datos de ESTs del Instituto de Investigación en Genómica (<http://www.tigr.org>), además se utilizaron microsatélites previamente mapeados (Milbourne *et al.*, 1998, Ghislain *et al.*, 2004 y Feingold *et al.*, 2005), siendo hasta ese momento el mapa genético más completo basado en marcadores microsatélites.

El mapa UHD sirvió como base para la construcción del mapa físico de papa dentro del Proyecto de Secuenciamiento del Genoma de la Papa o PGSC (Visser *et al.*, 2009) ya que permitió anclar secuencias genómicas en posiciones más exactas. Con el objetivo de elucidar la secuencia del genoma de la papa, se formó como una iniciativa del Departamento de Mejoramiento de la Universidad de *Wageningen* (Holanda), formando un Consorcio de investigación integrado por 14 diferentes países, entre los que se encuentra el Perú.

Al inicio del proyecto, se eligió secuenciar una línea diploide llamada RH89-039-16 (RH) desarrollada a partir de la papa cultivada *Solanum tuberosum*, utilizando la estrategia BAC x BAC (construcción de genotecas genómicas en cromosomas

artificiales de bacterias), el secuenciamiento de ADN por la tecnología de *Sanger* (método enzimático de terminación de cadena empleando nucleótidos modificados) y el mapa UHD (mapa ultradenso basado en marcadores AFLP) para la ubicación de las secuencias.

Sin embargo, debido a la dificultad en el ensamblaje y extensión de *contigs* (conjunto de secuencias de ADN que sobrelapan entre sí) causada por la heterocigosidad del genotipo RH, se decidió secuenciar un nuevo genotipo: DM1-3516R44 (DM), una línea doble monohaploide de la especie *S. phureja*, ya que el uso de individuos doble monohaploides (DM) permite la construcción de mapas de ligamiento de manera más eficiente.

La utilización de las tecnologías de secuenciamiento han permitido una rápida obtención de grandes segmentos de secuencias genómicas (*super-scaffolds*) pero con localización cromosómica desconocida. Con el fin de posicionar estos *super-scaffolds*, se construyó un mapa genético en una población de 169 individuos producto del retrocruce entre DI (accesión de *Solanum goniocalyx*) x F1 (producto del cruce entre DM x DI).

Para la construcción de este mapa genético, se desarrollaron abundantes marcadores moleculares (SSR o *Simple Sequence Repeats*, DARTs o *Diversity Arrays Technology* y SNPs o *Single Nucleotide Polimorfisms*), en el caso de los microsatélites se diseñó 550 marcadores SSR a partir de las 500 secuencias genómicas más grandes (*scaffolds*) resultantes del secuenciamiento de DM. De estos 550 marcadores, 100 fueron asignados a la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú) para la construcción del mapa genético final.

En el presente trabajo se analizó los 100 marcadores y con el fin de orientar y



posicionar estos *super-scaffolds* se construyó un mapa genético basado en los marcadores microsatélites asignados a la Unidad de Genómica de la UPCH y marcadores microsatélites mapeados anteriormente (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2008).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 1. Hipótesis

Los marcadores microsatélites polimórficos segregantes en la población DM permitirán ubicar puntos de anclaje de los *super-scaffolds* asociados a estos marcadores, dentro del mapa genético de *Solanum phureja*.

#### 2. Objetivo general

Cartografiar los marcadores microsatélites obtenidos de *super-scaffolds* (secuencias genómicas) del genotipo DM en un mapa genético de *novo*.

#### 3. Objetivos específicos

- ❖ Estandarizar las condiciones de amplificación por PCR de los marcadores microsatélites
- ❖ Evaluar el nivel de polimorfismo y la segregación de los marcadores microsatélites en una población *backcross* o retrocruza del genotipo DM.
- ❖ Posicionar los marcadores microsatélites dentro del mapa genético

## IV. MATERIAL y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

En el 2009, en la Universidad de Virginia de los EE.UU. se desarrollaron los individuos monoploides estables ( $2n=1x=12$ ) de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja, a partir de una progenie proveniente del cruce entre dos diploides heterocigotos: *S. phureja* x *S. stenotomum*. Los monoploides más vigorosos fueron sujetos de regeneración a partir de discos de hojas y luego se les estimó el número diploide de cromosomas ( $2n= 2x= 24$ ) con la expectativa de encontrar los dobles monoploides homocigotos (DM).

Uno de ellos, DM 1-3516R44 (CIP 801092) fue utilizado por el PGSC para la generación de la población utilizada en el presente trabajo. En el CIP, se realizó el cruce entre el individuo doble monoploide DM (CIP 801092), usado como parental femenino con un clon de *S. goniocalyx* (DI, CIP 703825) usado como parental masculino. Luego el híbrido resultante (DM/DI, CIP 305156.17) fue usado como parental femenino para el retrocruce con el individuo DI, resultando una población (DMxDI)xDI compuesta por 186 individuos.

Esta población fue mantenida como plántulas en el cuarto *in-vitro* que posee el Centro Internacional de la Papa (CIP) hasta la extracción de ADN. El ADN extraído de hojas de los individuos seleccionados fue proporcionado por el Centro Internacional de la Papa (CIP), entidad encargada hasta ese momento de realizar dicha extracción.

### 2. Extracción de ADN

El CIP proporcionó el ADN de todos los individuos integrantes de la población de mapeo así como de los padres ((DMxDI)xDI) y abuelos (DM y DI). Las extracciones de ADN se realizaron a partir de hojas y porciones de tallos frescos utilizando el método

de Herrera y Gishlain (1999) (Anexo 2).

### 3. Cuantificación de ADN y evaluación de la calidad del ADN

En UPCH se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de ADN proporcionado por el CIP a través de un espectrofotómetro NANODROP (ND-1000), evaluándose la relación entre las absorbancias 260/280 para determinar la contaminación proteica, y la relación entre las absorbancias 260/230 para determinar la contaminación salina.

La calibración del espectrofotómetro se realizó con agua libre de nucleasas o *NFW* (*Nuclease Free Water*) usada como muestra blanco, ya que el *stock* de ADN de las muestras fue diluido en NFW, para la cuantificación del ADN se utilizó 1.5 µl por muestra.

Con el fin de verificar la integridad del ADN se evaluó la calidad del ADN en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X visualizados por tinción con Bromuro de Etidio (Anexo 3).

Determinada la concentración del stock de cada una de las muestras, se obtuvo alícuotas a una concentración final de 5 ng/ul. Estas diluciones que se utilizaron durante todo el trabajo, fueron distribuidas en 2 placas de 96 pocillos conservándolas a 4°C.

### 4. Resuspensión de primers

Se utilizaron 166 pares de *primers* liofilizados (Tabla 3 y 4): 100 pares pertenecientes a la serie *PM* correspondientes a los microsátélites diseñados a partir de los *super-scaffolds* (secuencias genómicas grandes) con posición cromosómica desconocida generados por el PGSC y 66 pares de *primers* pertenecientes a la serie *S* (por su inicial de los marcadores: STM, STI y STGI) correspondientes a marcadores

previamente mapeados (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2008). Estos marcadores fueron utilizados como marcadores de ayuda durante la construcción del mapa genético, debido a que la ubicación de ellos ya estaba determinada y por ende se podía identificar los 12 grupos de ligamiento que corresponderían a los 12 cromosomas de la papa.

Los *primers* liofilizados fueron producidos por *Invitrogen (Life Technologies)* y resuspendidos en NFW a una concentración de 100 mg/ul según el número de moles totales disponibles en función de la cantidad de gramos suministrada por el fabricante. A partir de los *stocks* se realizaron diluciones a 10 mg/ul conservados a -20 °C para ser utilizadas en las posteriores amplificaciones.

Tabla 3. Secuencia *forward* y *reverse* de los *primers* de la serie “PM”

SSR	Forward Primers	Reverse Primers
PM0297	TTCTTGCTTGGTAGATTGCATTAGAA	TTTTGAGGGGCAATTGAGTCTTTA
PM0302	GTAGGAAGTTAGGTATGGACCGCC	TCGATTAGTGTTGCAGGAGTGTGT
PM0310	ACACGAACAGTCCAAGACATCAAT	TGACTTGAGAGTTTGTGTGGTTGA
PM0317	TGTTATATTGATCTTGTGTTTTGAATGA	CTGCATTTGTGTTGATTATAATGTGA
PM0319	TTTCAATCTATCACAGGATACAACACG	TGGACTAAAGAGCGTCTGAATCAGTAT
PM0321	TGGCGATAAATACATGAGTTCCCT	TCACAATCCTTCAATGTAAAAAGGTG
PM0323	AAGGGATAAAAGTGGTAACTCCGA	TTTGGTTTTCTGGTTTGATTTTGG
PM0327	TATTGCTATCTTAGTTCGCTGCCC	AATATGACTAAACCCATAAGCGAAGC
PM0329	TGTACCCCTATGTGTTATGCCTTATCC	CCACGTAGGCTATCCTAGGGTTCT
PM0331	TGGTGGTTGTTGGTTAGAGAACTT	TGGGATTTGAGTTGACTGAATTGTT
PM0333	GGGTGGGGTATTTAAACACGATA	TGGTCCTAACTCCACAACACTTCA
PM0336	GCATATGCTTAGGGCGCTCAATA	ATACATGGAGTCCAGGGGTTTCATC
PM0338	TGCATCTTTCATTGTTGCTCTATCC	TTTGGAACCTGATGGAACATAAGCA
PM0342	TTTTTCAATTTGTATCTTGGCATGT	ATTCCTGCCCCTCTTATTCTTTTT
PM0344	TCCTTCATTTCTTCGTTGTTTTCT	AAATCACTCCTTTGCTCAATATTTCTC
PM0346	TGGAAATACATGCATATTCTAATCACA	CTTATCTTTCAAGCCCAAGATCG
PM0348	GGCGAACTCTTCATGTCTTGAAC	TGTGCTTGTGTTACCTATATTTGAGTGA
PM0353	TCCTATTTCAATTTGAGGGGTGTT	TGTGAGGATGTTGGTACACTTGGT
PM0355	TCGAAATACTATCACGGACCAACA	TGACATCAACTCACGTTCACTATCTTT
PM0360	TCCCCAAATTTTACTTTGAAACAAG	TTATTTTCATGCCACAAAGTAGCG
PM0362	GTGAAACGGCATGTCCTTAATTCT	TTCTCTAGGGACAACATGGAAAA
PM0364	TGCATCCCTGTCTATTAAGCATGT	TCGAGATGCAATGTTAAATCAAGC
PM0365	CTTGATCTATGACTGGGCGGA	TGGTGGAACTCTTAATTAGTGGTAAGA
PM0371	GCATGCACATGATGTAACAACAAC	CCCCAAAACAGAAAATGAAAGATT
PM0373	TTGAGGGGTAGTTAAAATTGAAAAA	CACCATGTTTCTGTGTCAACATGA
PM0376	CTTCTAAGAGGTGCCACATCAGTG	CCCAAAATTTGAGGAGACTCATTT
PM0378	AACCTTTTTCTTATTGGTTTGCGA	CTACTCTTCCAGCAAAAGCAAAG
PM0380	TGGTTTACTCAGTGGTCTATATCAGCA	CCCAGCAATGTATTACTTTTTGCC
PM0382	GAGCTTGATTCTCAACCCTACCT	TTCAAGTCATTAACCACCCCATTT
PM0385	TGCAAGTTTCCAATTTACCCATTT	CGGTAAGGATTTTGCTATCTACGTG
PM0388	GACTTTTTCTTGAAGCCCTAGCTGA	AAACACCCAAATATTTCCCAAGT
PM0395	CAAAAATAAACAAATTCCTTTTTCCC	TTTTTGGTACAAATTTTGATGTGTTT
PM0404	CTCTAACGAGGGAGGGAGTACCAT	TCCACCAATCTAGCTGATGTTCAA
PM0406	TTTCCGAAACCTTTGGTCTTCATA	TGGAAGAACCTAGGCAATTTCTTG
PM0408	CTAGATCCCATTGTCTGCATCA	TCCTACCCATACCTCTATGGTTCTTG
PM0413	TGGTGGTAAATTATATACATGGCAAAT	GCTTTTCTTTCACTTACTCTTGCC
PM0417	AAACATAATCATCGTGAAAGGCAA	AAAAATCGAAAGAACCATAATTTCTCT
PM0420	CTGTGTGACGTAACGAAATGTGCAA	CCTCCTGCTCTCTATCTCTCCCTC
PM0423	ACGAAGTGTTCAAATCTCCAGACC	TTGGAGAAGACTGGCGTAGGTTTA
PM0427	CCACGTGATATGTTTAAACACCAA	TCAAGTGCTAGACATGAAATCTCCA
PM0429	CAGATATCAGTTAAGTATTTGAACCCCC	GAGGGTAAACGGGAAGGAAAAA
PM0434	CCTTCTTGAAAATGAAGGAGGTTG	GCCAAGATTCACCTCAACTTTGGTT
PM0436	CTCCTCTTATCCCAAAGTTTTCCC	TGTTAGTTCTTGTGGCAATTGAA
PM0439	AACAACCACAATACCCCAATCAAG	ACAATTGCTTATTTGTTGGGTGG
PM0442	CACAAATTGACCAAGCGTAGAAGA	CAAGATGCTGTCAGGTTCTGTTTG
PM0449	AAAATTTTCATCTTCCTTCTGTAAAGTG	TGCATTGGTTATATGAATTATTGATTG
PM0451	ATCTATGGAAGGTCAATGGCTTCA	TCGTGTGCATATGTTTGATCACTG

SSR	Forward Primers	Reverse Primers
PM0458	GCCCCCTTTCTCTTCTCTAATTTTC	GAGAGGAGAACGAAGAAGGTGGAT
PM0459	TGCTAGCACAGTTATTCTAGGGCT	TGGGATCTTGGATTGTATTGATT
PM0461	GGACCAACAATGATTCTCGAGTG	GCGCTTATTCGAGAAGGGTAATTT
PM0464	TTGAACTGAAGATAGGTGTTGGGA	GGGATTTCACTCCTAGTGGGATTT
PM0467	TTCTCTGTTCTTATAATGAAGGGGATT	TGCATCTTAAGTCATCAAAAATACAAAA
PM0469	CACACACCCTTAGTCTTTTCCAAC	GGAGCTCCTTCAATTGATTTGTA
PM0471	GACAGATGAAAAACAACCTTGTC	TCCAACCTCATCCAATTTTATCAAG
PM0473	AAGGTGCAAATGGAGCAAAAATAC	CCCTGGTGATTTCTCAGTTCTAAAAAG
PM0475	ATCTCCCAATCTCTCCCTATCTCC	TCTACGATGATTGACTCCAACCAA
PM0478	AAAGTTGAGACCAGAAGCCATTTG	AATCTTGCAACTGCTGACACAGTAA
PM0489	CAACTTTTCTATTCTTCGTACATCA	TCATGCACATTACCATATCAACAA
PM0492	TTTTTGAAAATTTGGGACAAGTTCA	AAGTGTTTGAGTCAAGGAAGGCAC
PM0493	TCTAATGTCTAAAACCTTGCAATTCCTG	GAACCAGGGAGACCAGACAGAATA
PM0495	CACAAAACTGACCAACAATTGGA	CTACTAACCTCCTCCCTCACACCA
PM0497	ACAAGAGCTGGGACTCAACAATTT	AAGACGACTTACACCCCAAGACTAA
PM0503	GTTCTTCTGATGCTTGTGGGATAAG	CTCGAATACCTTCGTTGTAATCC
PM0505	TCATCATTGTGTAAACAAAAGAACAAT	TGCAATAATTTTAATTGATGGCTTATTA
PM0507	TGGTTACTCTGTCTATGGCATTATTTT	GGAATATGTTCTCATAAAACCTTGG
PM0512	CATTTGTTTCATGGTGCTCTATGCT	GACAGACCTACATAGAGTTGCGCG
PM0518	TGTAATGCATGGTTTGATATTCACG	AAGTGTTGGTCAAAGTCCATATCATTT
PM0520	CAGGACCAAAACAAAACCTTACCCA	TTATGAGGCACCAAAATTCATCTCA
PM0522	TGTTCTAATTCCTTTTGCCACGAT	TGTGCTCATGGATTGTCTTTTCATT
PM0527	CGAAAAATCACAACCCGTAAAAA	TTTCACGTAGATGTTATGACCCCTC
PM0529	TCTTTGCCAACTTTTACAATTTT	TTTATTTTCCACTTCCGTGCAAT
PM0530	CATCAAAATTTCTGGTGGGTATGAA	GCACGGGCAAGAACCATCTA
PM0531	TTCTTTTGGTTTGCATTTTCTTG	ACCTCGTATTAATAAAATTTGCGATG
PM0538	GGTTTAGCGACATATACAAAGAATGC	TGTTTGATTGTGAGTGTGTGAAGG
PM0541	TATGCCCTCTTCCTTCTTCTCCTT	ATACCCAAAATCCTCACCAAGAAA

Tabla 4. Secuencia *forward* y *reverse* de los *primers* de la serie “S” anteriormente cartografiados (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2008)

SSR	Forward	Reverse
StI0001	CAGCAAAATCAGAACCCGAT	GGATCATCAAATTCACCGCT
StI0002	ACAGGAATCACACCTGCACA	TTCAACATCCGCCTGTCATA
STI0003	ACCATCCACCATGTCAATGC	CTCATGGATGGTGTCAATTGG
StI0008	CATCTCCTTCACCTGCTCCT	CGACAAAAGGAGGAAATCCAA
StI0009	GCGAAAACCTTGAAGCAACT	CTGCTGTTGCTGTTGATGGT
StI0012	GAAGCGACTTCCAAAATCAGA	AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA
StI0018	CCACTACTGCTTCTCCACC	GCAGCAACAACAAGCTCAAC
StI0019	TCCCTGTTGCCCTTGAACAAT	TGGGAAAAGGTACAAAGACGA
STI0022	TCTCCAATTACTTGATGGACCC	CAATGCCATACACGTGGCTA
StI0026	CAACGCTACTCAATGGCTCA	ACAACCTCTAGAACGAGAGGAACA
StI0028	ATACCTTCCAATGGGTCCTT	CTTGGAGATTTGCAAGAAGAA

SSR	Forward	Reverse
SH0030	TTGACCCCTCCAACATAGATTCTTC	TGACAACTTTAAAGCATATGTCAGC
SH0031	AGGCGCACCTTTAACTTCCAC	CGGAACAAATTGCTCTGATG
SH0032	TGGGAAGAATCCTGAAATGG	TGCTCTACCAATTAACGGCA
SH0036	GGACTGGCTGACCATGAACT	TTACAGGAAATGCAAACCTCG
SH0038	CCAAATGAGGCTAAGGGTGA	GGCCAAGAAAATCAAGAACG
SH0040	TCTTTCCCTTTTATCCTCACTG	GGGATTGGGTTTGAAGTAGTTG
SH0043	CAATGCGAATGTTGCTACTGGT	ATCCACCAAGACCTCCAGAA
SH0049	GGAAGTCCTCAACTGGCTG	TCAACTATATGCCTACTGCCCAA
SH0050	TTCCTCTAAGCGGCAAAAGG	GGAGGAGACTTGGGTTTCTCC
SH0051	GGTCTCCATTAGCCCTCTGAG	ACATAAATGGATCACACA
SH0052	TCATCACAACGTGACCCCA	GGGCTTGAATGATGTGAAGCTC
SH0054	GCCACTATGCAAGCCCATTTG	GGGTCGATGTTTCGGTTGAG
SH0055	CCGTTGATGGGATTGCACA	TGATATTAACCATGGCAGCAGC
SH0056	GACAGAGAATATGGGACCACCA	GCAGCACCTTAAATGGCTGAC
SH0057	CCTTGTAGAACAGCAGTGGTC	TCCGCCAAGACTGATGCA
SH0059	AGACGGGTGCACACGCAC	TGCTTGAGTATGACAGCACTTGA
SH0060	ACTTCTGCATCTGGTGAAGC	GGTCTGGATTCCCAGGTTG
SH0061	AGCAACCACCACAGCAGC	CCGGCGATTGGATCGACG
STM0003	AATTGTAACCTCTGTGTGTGTG	GGAGAATCATAACAACCAG
STM0006	GAAGTTGACATTGAGCCC	GGATATCCATTCTTAGATGCA
STM0013	AACATCAACTAAATGCCTTTTT	TTAATATTTTTACTCGGCTATTG
STM0037	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC	ATTTGGTTGGGTATGATA
STM0040	GCAATAATGGCCAACACTTC	TGGGAAATGTTAGTCAAAAATAGC
STM0051	TACATACATACACACGCG	CTGCAACTTATAGCCTCCA
STM1004	ATATGAAATTCTCTCGATGTTTCG	TCAGCCCATAAAXCTTTAGTTACCT
STM1016	TTCTGATTTTCATGCATGTTTCC	ATGCTTGCCATGTGATGTGT
STM1051	TCCCCTTGGCATTTCCTTCTCC	TTTAGGGTGGGGTGAGGTTGG
STM1052	CAATTCGTTTTTTCATGTGACAC	ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA
STM1056	AGGTAAGTTTTATTTCAATTGC	GGGTATGGGAATAGGTAGTTT
STM1057	TTATGTTTCGGTTAAAATGTA	AAATTAAATGGAAGACAACC
STM1104	TGATTCTCTTGCTACTGTAATCG	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA
STM1105	AAACCTGCTACAAATAAGGC	CAGAAATAATTGGAGGAGATG
STM2020	CCTTCCCTTAAATACAATAACCC	CATGGAGAAGTGAAAACGTCTG
STM2022	GCGTCAGCGATTTCAGTACTA	TTCAGTCAACTCCTGTTGCG
STM2028	TCTCACCAGCCGGAACAT	AAGCTGCGGAAGTGATTTTG
STM3009	TCAGCTGAACGACCACTGTTC	GATTTACCAAGCATGGAAGTC
STM3016	TCAGAACACCGAATGGAAC	GCTCCAACCTACTGGTCAAATCC
STM5114	AATGGCTCTCTGTATGCT	GCTGTCCCAACTATCTTTGA
STM5115	TCTCCCCCTTCTATCCTCTT	TCAACCTGGTGAGATCCAACA
STM5119	TGGCCTAGATACATCCGAA	GGCAAAGTGATCGGATGAGAA
STM5126	GCAACAGCGCATCAACAAA	TCCAAATCCATCCATTGAG
STM5140	GCTATTGTTGCAGATAATACG	GCCATGCACTAATCTTTGATTC
STM5145	TGGAACGAGAGGTGGTTT	GGATGTTTTCTCACTGGTTTCG
STM5146	AGACCTTACGAACATATCCC	TACAACCATAGAAGCAGCAGCA



## 5. Estandarización de las Condiciones de Reacción de PCR

La estandarización del protocolo del PCR, consiste en definir las condiciones óptimas de amplificación de cada par de *primer*. Los parámetros evaluados para la estandarización de la reacción fueron la temperatura de alineamiento o Ta (*Annealing temperature*), concentración de *primers* y la concentración de componentes como: NFW y MgCl<sub>2</sub>.

En la Tabla 5, se muestra las concentraciones finales para cada uno de los componentes de la mezcla (*master mix*) para la amplificación por PCR de cada *primer*.

Tabla 5. Componentes del *master mix* del PCR.

Componentes del <i>master mix</i>			
Reactivo	cc	Vol (1 rxn)	Vol (10 rxns)
NFW (SIGMA)		4.1- 5.1 µl (según la cant. de ADN)	52.0
Buffer Go Taq (Promega)	5X	2.0 ul	20.0
MgCl	25mM	1.0 ul	10.0
dNTPs	10mM	0.2 ul	2.0
Dye 700, 800 (LI-COR)	1 µM	0.1	1.0
Iniciador F	10uM	0.2 ul	2.0
Iniciador R	10uM	0.2 ul	2.0
Taq Pol		0.2 ul	2.0
ADN	5ng/ul	1.0 ul – 2ul (dependiendo del <i>primer</i> usado)	
Volumen total del <i>master mix</i>	10 µl por rxn		

NFW: agua libre de nucleasas. Buffer Go Taq=Solución tampón, MgCl=cloruro de magnesio.

dNTPs = deoxinucleótidos. Taq Pol = enzima Taq. cc= concentración. vol = volumen. rxns=reacciones

Las temperaturas de *annealing* se determinaron a través de ensayos de gradiente de temperatura, las cuales variaron entre 50 °C - 60 °C y 55 °C - 65 °C. Los ensayos se realizaron utilizando ADN sólo de los individuos DM y DI.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en condiciones óptimas para cada par de SSR. Se utilizaron los termocicladores *Eppendorf Vapo.Protect* y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- a) INICIO: 1 ciclo de 94 °C por 4 minutos
- b) DESNATURALIZACIÓN DEL ADN: 1 minuto a 94 °C, fase en la que se separan las hebras del ADN molde y del iniciador.
- c) ALINEAMIENTO: aquí se realizaron las pruebas de gradiente de temperatura entre 50 °C a 65 °C, esto duró 1 minuto. En esta temperatura el iniciador se une correctamente con la región complementaria en el ADN molde.
- d) EXTENSIÓN: 72 °C por 1 minuto, actúa la ADN polimerasa con el fin de sintetizar la cadena complementaria y utilizando al iniciador como soporte para la síntesis del nuevo ADN.
- b), c) y d) se realizaron durante 30 ciclos.
- e) ULTIMA EXTENSION: a 72 °C por 4 minutos, para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

Y finalmente una etapa para conservar la reacción a 4 °C *overnight* (toda la noche).

## 6. Evaluación del polimorfismo de los marcadores microsatélites

Inicialmente, el nivel de polimorfismo se evaluó con los individuos DM, DI y los seis primeros individuos de la población de mapeo ((DM/DI) x DI) como paso previo a la amplificación en la población completa. Determinado el polimorfismo se procedió a la

amplificación de los microsatélites polimórficos en toda la población de mapeo (los 186 individuos).

## 7. Electroforesis

Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % (Anexo 4) mediante el analizador genético LI-COR 4300 (*Bioscience*). El tiempo de corrida electroforética a 1 500 voltios fluctuó entre una hora y media a dos horas (dependiendo del tamaño del producto amplificado).

Para la visualización de los productos, se les añadió 5 ul de una solución de carga llamada *Blue Stop Solution* (BSS) a cada uno de los pocillos de la placa de PCR que contenían los productos de la amplificación, se homogenizó, para luego someterlos a denaturación en un termociclador por 5 min. a 94 °C, incubándose la placa de PCR en hielo para finalmente ser cargados.

Se tomó 0.7 ul de cada una de las muestras y se sembraron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida, además para estimar el tamaño de los alelos se sembró a ambos extremos del gel 0.5 ul del marcador de peso molecular de 50-350 pb IRDye. Primero se sembraron las muestras marcadas con fluorescencia a 700 nm. y luego de 5 minutos se sembraron las muestras marcadas a 800 nm.

## 8. Genotipado

Se utilizó el marcaje M-13 o también conocido como M13-tailing, es decir se utilizaron los *primers* (*forward*) a los cuales se les añadió una secuencia de 19 nucleótidos (5'-CAC GAC GTGTA AAA CGA C-3') al extremo 5', el cual es el sitio de unión del IRDye-labeled M13 Primer 700 y 800 que es añadido también al *master mix*, quedando marcados los productos amplificados para ser detectados por el láser del analizador LI-COR 4300.

Para el trabajo en este analizador se creó el proyecto llamado: “*DM-Mapping*” en el software SAGA<sup>GT</sup> *Microsatellite*. En este proyecto se ingresaron datos generales como: los pesos del marcador desde 50 pb - 350pb IRDye, nombre del marcador evaluado (según sea el *primer* a analizar), los dos tipos de marcaje de los microsatélites (700 u 800 nm) y finalmente se introdujo el código de identificación de cada individuo a evaluar (el código de identificación de cada uno de los individuos de la población de mapeo). Antes de cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, se realizaba una pre-corrida, la cual duraba 10 minutos, con el fin de que el *láser* enfoque y reconozca el gel a trabajar.

El genotipaje se realizó en el analizador de ADN (LI-COR 4300) junto con el software de análisis SAGA<sup>GT</sup> *Microsatellite*, cuando los locus marcados con IRDye M-13 pasan frente al *láser* del equipo son reconocidos de acuerdo a su longitud de onda en 700 nm u 800 nm y se presentan en forma de bandas en la pantalla del computador. Al terminar la corrida, dicha imagen se guardó en SAGA<sup>GT</sup> en formato \*.tif.

Este sistema de genotipado (SAGA<sup>GT</sup>) es un asistente de lectura de imágenes que ofrece precisión en la estimación del tamaño de los fragmentos y el análisis de los datos de una forma semi-automatizada.

## 9. Construcción del Mapa Genético

Los datos generados a partir del software SAGA<sup>GT</sup> *Microsatélite* fueron ingresados en una hoja de Microsoft Excel, en donde se elaboró una matriz binaria de datos con los tamaños y la presencia o ausencia de cada uno de los alelos que presentó determinado marcador (Tabla 6).

Tabla 6. Matriz binaria de datos con la presencia/ausencia de los alelos (PM0365-a,b,c) del marcador microsatélite PM0365 en los individuos de la población de mapeo

Alelos	Tamaño (pb)	DM	DI	F1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PM0365-a	144	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0
PM0365-b	138	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
PM0365-c	135	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1

pb: pares de base. DM: doble monoploide. DI: doble heterocigoto. F1: (DMxDI)xDI. 1-15: individuos integrantes de la población de mapeo

Los *loci* fueron evaluados según el tipo de segregación, el cual consiste en definir los modelos de segregación de cada *loci* microsatélites. La población en estudio constaba de individuos productos del cruce interespecífico de individuos de polinización cruzada, lo cual implica que puedan tenerse segregando hasta cuatro alelos distintos, abriendo diversas posibilidades de combinaciones genotípicas (Tabla 7), los posibles casos de segregación serían: segregación de un alelo del parental masculino heterocigoto (<lmxll>), segregación de un alelo del parental femenino heterocigoto (<nnxnp>) y teniendo ambos padres heterocigotos la segregación de 2 alelos.

Por tanto, los modelos de segregación que se ajustan a los marcadores estudiados son aquellos en la los alelos segregan para uno de los padres: <lmxll> o <nnxnp> ya sea para el progenitor masculino y femenino, respectivamente o para alelos segregantes de ambos padres heterocigotos.

La data de segregación se evaluó y registró de acuerdo al sistema de codificación presentado en la Tabla 7.

Tabla 7. Códigos utilizados para los tipos de segregación para una población CP (“Cross Pollnation”) con sus posibles genotipos

Código según Tipo de segregación	Descripción	Posibles genotipos
<abxcd>	Locus heterocigoto en ambos progenitores, 4 alelos	ac, ad, bc, bd, --
<efxeg>	Locus heterocigot en ambos progenitores, 3 alelos	ee, ef, eg, fg, --
<hkxhk>	Locus heterocigoto en ambos progenitores, 2 alelos	hh, hk, kk, h-, k-, --
<lmxll>	Locus heterocigoto en un progenitor	ll, lm, --
<nnxnp>	Locus heterocigoto en el otro progenitor	nn, np, --

“a – p”: alelos distintos, “-”: alelo desconocido, “h-,k-”: genotipos dominantes

La data con el nuevo sistema de codificación para la población de tipo CP para cada uno de los marcadores amplificados en los 186 individuos (Tabla 8) fue convertida a un formato especial para ser ingresado al programa *JoinMap* 3.0 (Van Ooijen y Mallepaard, 1996) con la extensión “.loc”.

Tabla 8. Genotipos transformados según la codificación determinada para el tipo de población CP para el marcador PM0365

Alelos	Codificación	DM	DI	F1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PM0365-a	<lmxll>	lm	ll	LI	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	ll	ll	lm	ll	lm	lm	ll	ll
PM0365-b	<hkxhk>	kk	kk	h-	kk	kk	h-	kk	kk	h-	kk	h-	h-	h-	h-	h-	kk	h-	h-
PM0365-c	<nnxnp>	nn	np	Np	np	np	nn	np	np	nn	np	nn	np	nn	np	nn	np	np	nn

DM: doble monoploide. DI: doble heterocigoto. F1: (DMxDI)xDI. 1-15: los 15 primeros individuos integrantes de la población de mapeo.

Con el fin de aumentar la saturación y formar los 12 grupos de ligamiento correspondientes a los 12 cromosomas de la papa y determinar de manera más precisa la posición de los marcadores de la serie PM, se utilizó el registro de presencia y ausencia de 154 alelos generados por 54 marcadores de serie PM (asignados a otros equipos de trabajo: Instituto de Investigaciones Agropecuarias - Chile, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuarias - Argentina, también miembros del PGSC).

Se creó el proyecto: “MAPEO TESIS” con la función de la barra de herramientas “*New Project*” del programa *JoinMap*, luego se cargó el archivo convertido “.loc” con la función de la barra de herramienta “*Load Data*”, con lo cual apareció un panel mostrando diferentes pestañas, las mismas que contenían el resumen de toda la población de mapeo (*Info*), versión organizada de los datos del archivo (*Data*), información de cada uno de los individuos de la población (*Individuals*), información de todos los *loci* en la población (*Loci*) (Figura 2)

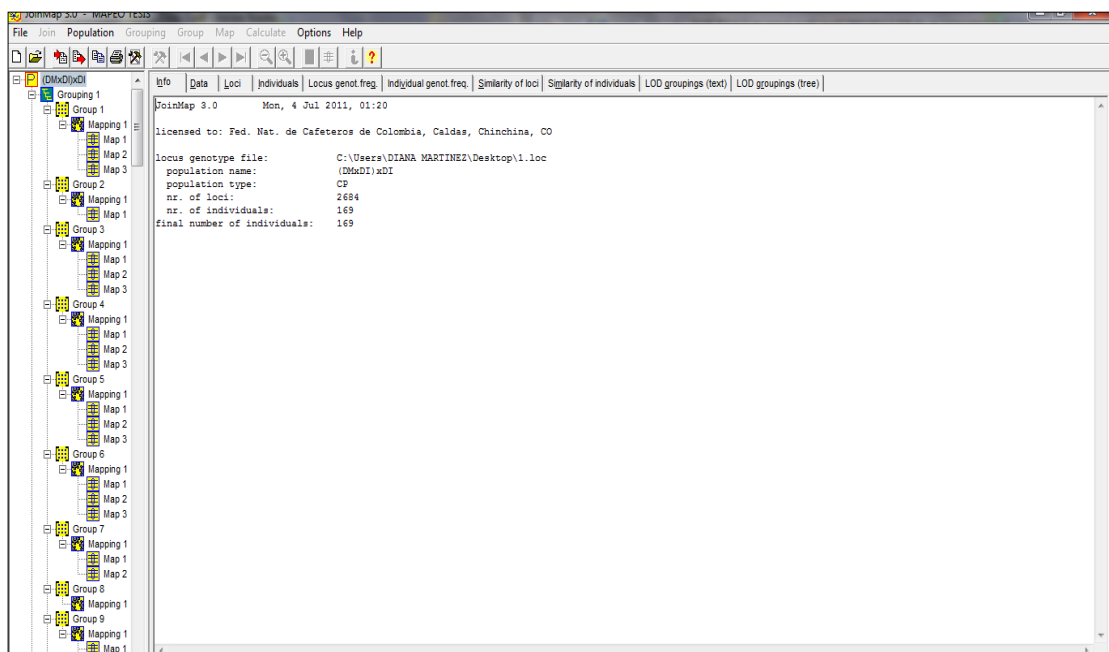


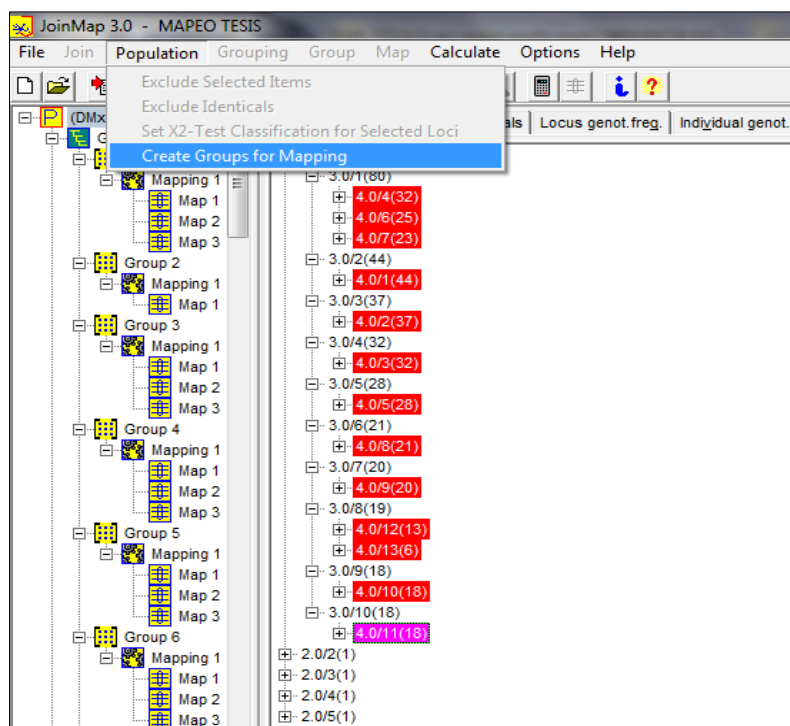
Figura 2. Ventana del proyecto “Mapeo Tesis” con diversas pestañas que contienen la información de la data ingresada

Se realizó la verificación del padrón de segregación de cada uno de los *loci* con el fin de identificar aquellos marcadores que presenten distorsiones en la segregación a través de la prueba estadística de  $\chi^2$  (nivel de significancia:  $p \leq 0.05$ ), esto se realizó a través del comando “(Re)calculate” en la pestaña “*locus genotype frequency*” del programa *JoinMap*. En el programa *JoinMap*, los niveles de significancia se evidencian a través de la presencia de asteriscos (\*), una mayor cantidad de asteriscos significa un mayor grado de distorsión de segregación, por tanto para este trabajo se tuvo como límite de significancia:  $p=0.005$  o “\*\*\*\*” (Figura 3).





Figura 4. Los 12 grupos de ligamiento seleccionados con un LOD score=4



En este nuevo nodo se observaron los 12 grupos de ligamiento y a diferencia del nodo anterior, donde se presentaron datos por *loci*, en este nuevo nodo se presentaron los 12 grupos de ligamiento pero con información de cada par de *loci*, por ejemplo como el valor de la frecuencia de recombinación para cada par, el número de grupo al que pertenece cada uno de los *loci*, el valor del LOD por el que fueron agrupados y los *loci* que fueron removidos antes de la creación de los grupos (número de grupo=0).

A partir de este nodo se calculó un mapa con el comando “*Calculate map*” para cada uno de los grupos de ligamiento (Figura 5). El mapa está basado en el set de *loci* seleccionados y en el set de pares de *loci* seleccionados, siendo las frecuencias de recombinación convertidas a distancias de mapa (cM) usando la función de *Haldane*.

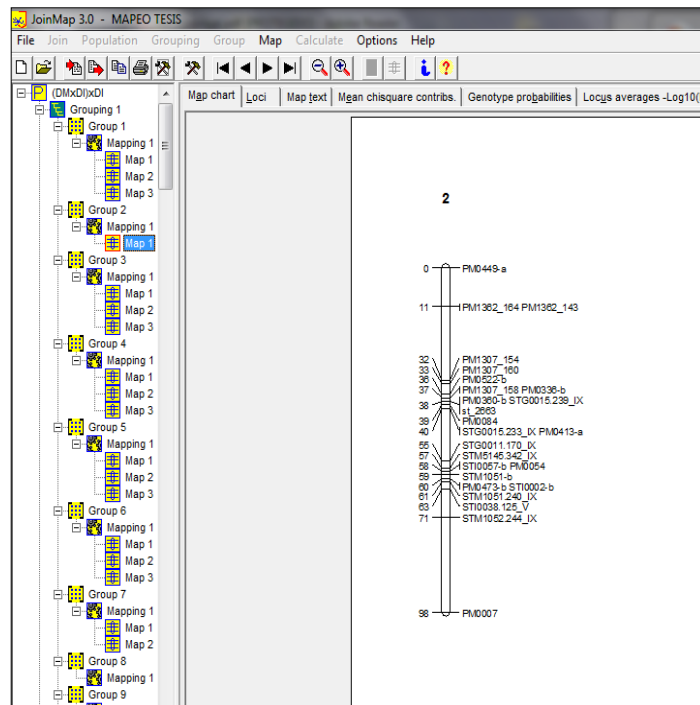


Figura 5. Mapa generado para el grupo de ligamiento 2

Finalmente el archivo de los grupos obtenidos en el programa *JoinMap* fue exportado hacia el programa *MapChart* con el fin de editarlos para presentar sólo los marcadores trabajados en la Unidad de Genómica.

#### 10. Ubicación de los *super-scaffolds* en el mapa genético

Con los marcadores de la serie “PM” ya posicionados en los 12 cromosomas de la papa, se procedió a ubicar los *super-scaffolds* de DM que contienen a estos marcadores, esto a través de un *Blast* (alineamiento de las secuencias de los marcadores vs. secuencia completa del genoma de DM).

El *Blast* se realizó con las secuencias *forward* y *reverse* de cada *primer* contra toda la secuencia del genoma de la papa, a través de la página: <http://yh.genomics.org.cn/potato/login.jsp>. Ubicar los marcadores en el *super-scaffold* respectivo, permitió la ubicación cromosómica de los mismos, para de esta manera ayudar al ordenamiento de estas grandes secuencias genómicas productos del secuenciamiento.

## V. RESULTADOS

### 1. Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN

La concentración de ADN fue alta en todas las muestras. En el análisis de la relación de absorbancia A260/A280, los valores menores de 1.8 son indicadores de contaminación proteica del ADN, los valores entre 1.8 y 2.0 son indicadores de pureza del ADN en cambio valores mayores a 2.0 indican contaminación con fenol. Todas las extracciones de ADN obtenidas presentaron una relación de absorbancia A260/280 entre 1.97 y 2.07 (Anexo 5), indicando que el ADN no se encontraba contaminado por proteínas que pudieran interferir con las reacciones de amplificación de PCR.

En cuanto al análisis de la relación de absorbancia A260/A230 (Anexo 5), en todas las muestras fue mayor a 2.0 en todas las muestras lo que indica que el ADN estaba puro, un valor menor a 2.0 sería un indicador de contaminación salina.

La extracción de ADN genómico es una etapa importante en el estudio con marcadores microsatélites, debido a que es imprescindible obtener el ADN íntegro y de alta calidad con el fin de evitar inhibir o interferir con las amplificaciones por PCR. Según el Anexo 5, se puede observar que el ADN extraído de todos los individuos es de buena calidad y concentración.

### 2. Estandarización de las Condiciones de Reacción de PCR

Para cada uno de los marcadores se escogió una temperatura de *annealing* ideal con el fin de reproducir perfiles limpios de bandas. En cuanto a la cantidad de ADN utilizado para las amplificaciones, se utilizaron volúmenes de 1 ul y 2 ul del ADN, es decir concentraciones de 5 ng/ul y 10 ng/ul de ADN, respectivamente, con el objetivo de mejorar la intensidad y resolución de las bandas productos de la amplificación.

### 3. Evaluación del Polimorfismo en los marcadores Microsatélites

Para la selección de los microsatélites se determinó inicialmente si son monomórficos o polimórficos y si son segregantes. Durante la determinación de la temperatura de *annealing* de cada marcador microsatélite, se pudo identificar a 26 marcadores de la serie PM (16% del total de marcadores) que no amplificaron producto alguno o presentaron patrones de mala amplificación (Anexo 7), mientras que todos los marcadores de la serie S resultaron ser polimórficos mostrando bandas nítidas.

En cuanto a los marcadores de la serie PM, 31 (18,6% del total trabajados) de los 140 marcadores restantes mostraron un patrón monomórfico (Anexo 7), es decir la presencia de una sola banda en todos los individuos de la población, quedando finalmente 109 marcadores (65,6%) que resultaron polimórficos y a los que se les analizó el tipo de segregación que presentaron.

### 4. Amplificación de los Microsatélites en la Población Completa

Para la amplificación en toda la población (Figura 6: A y B), se seleccionaron aquellos marcadores que presentaron alelos de DM segregantes en la descendencia (es decir, aquellos que presentaban al menos un alelo segregante de DM).

Con los 109 marcadores (43 de la serie PM) polimórficos seleccionados se amplificaron 236 *loci*, los cuales presentaron tamaño entre 116 pb hasta 278 pb, para la determinación de estos tamaños se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb - 350pb IRDye. Sin embargo, para el marcador STM5119 que mostró 1 alelo de tamaño superior a los 350 pb se utilizó un marcador de peso de 100 pb – 700 pb IRDye, con el fin de determinar de manera más exacta el tamaño de cada uno de los alelos para este marcador, los cuales variaron entre 107 pb a 378 pb, además se modificó el tiempo de corrida de electroforesis de 1 hora y media a 2 horas y media.

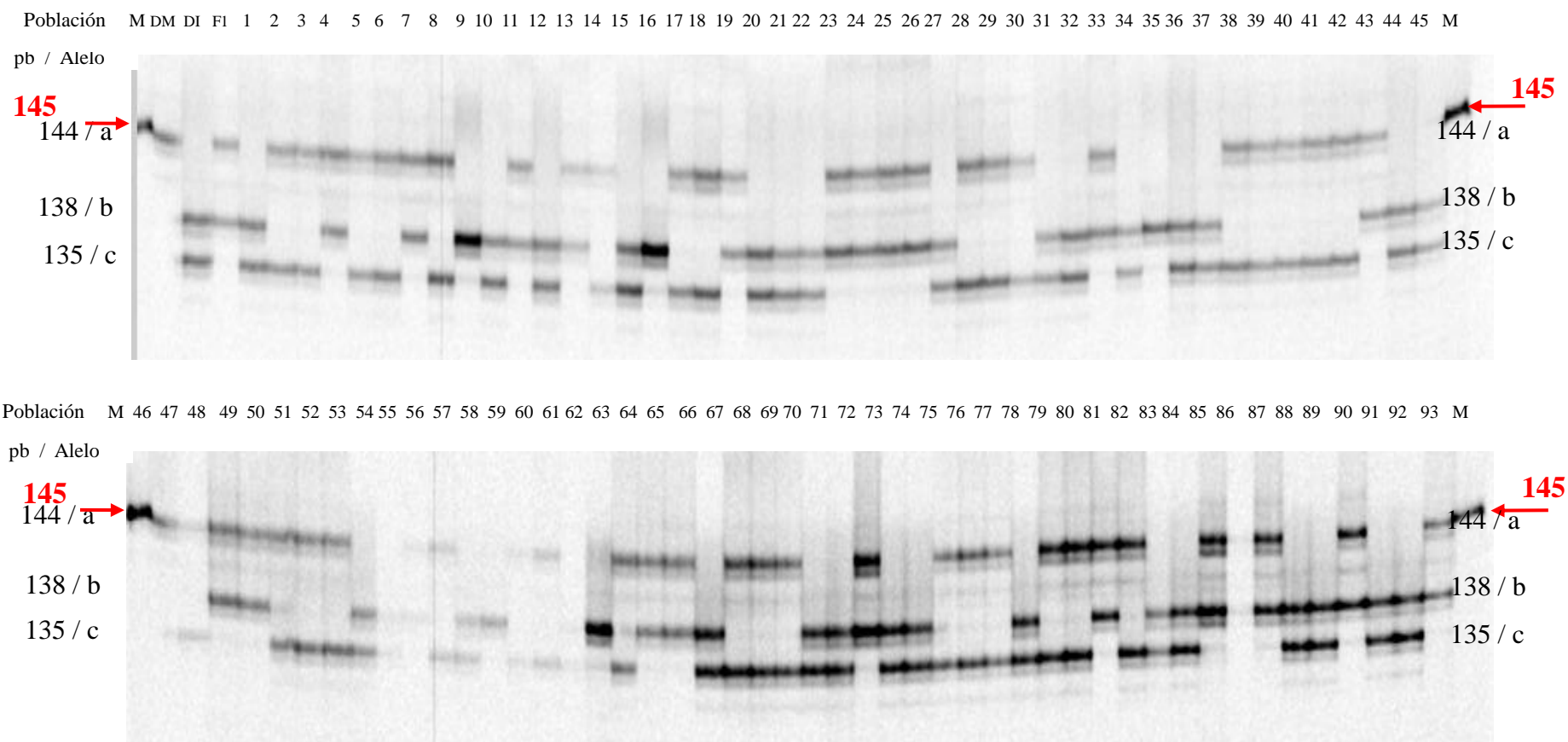


Figura 6. A) Visualización de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (Li-COR) del microsatélite PM0365 en la población de mapeo. DM: individuo doble monoploide derivado de *S. phureja*. DI: individuo de *S. goniocalyx*. F1: híbrido resultante del cruce de DMxDI. 1-93: individuos de la población resultante del cruce (DMxDI)xDI. pb: pares de bases. M: marcador de peso molecular 100 pb. 145: peso de la banda del marcador. a,b,c: alelos

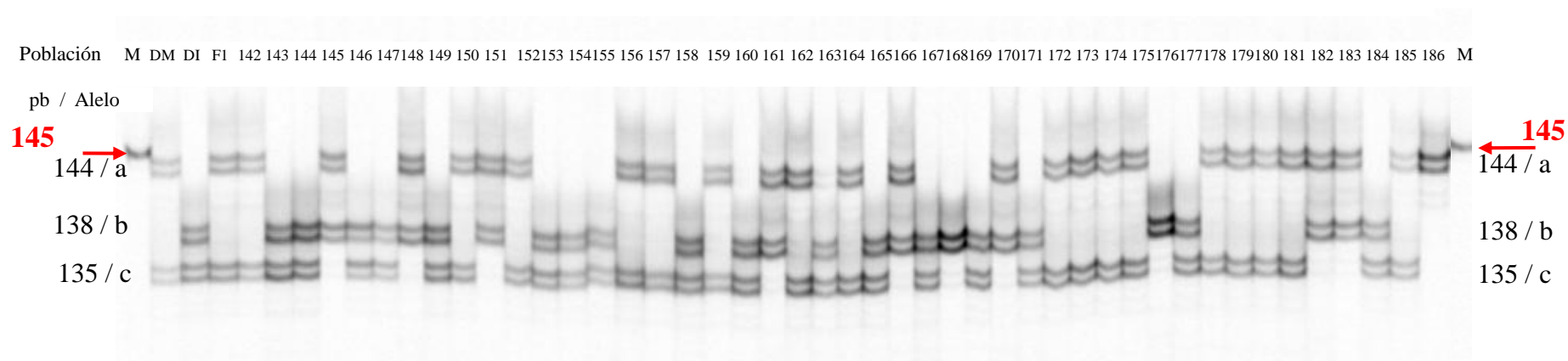
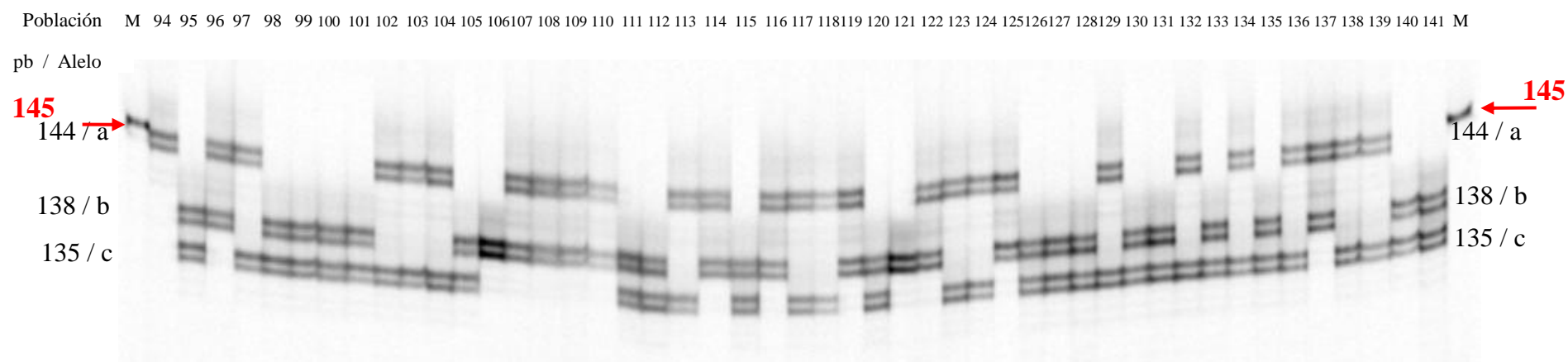


Figura 6. B) Visualización de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (Li-COR) del microsatélite PM0365 en la población de mapeo. DM: individuo doble monoploide derivado de *S. phureja*. DI: individuo de *S. goniocalyx*. F1: híbrido resultante del cruce de DMxDI. 94-186: individuos de la población resultante del cruce (DMxDI)xDI. pb: pares de bases. M: marcador de peso molecular 100 pb. 145: peso de la banda del marcador. a,b,c: alelos

## 5. Construcción del Mapa Genético

Para la saturación del presente mapa genético se hizo uso de la data de los *loci* generada sólo por los marcadores microsatélites trabajados por otros miembros del grupo PGSC, siendo utilizados en total 390 alelos.

Se descartaron 18 alelos (4,6%) debido a que mostraron patrones de bandas monomórficas, bandas que no aportan ninguna información para el fin del presente trabajo, quedando 372 alelos para continuar con el análisis.

Luego se procedió a identificar y descartar aquellos *loci* que mostraron distorsión de la segregación mendeliana, es decir aquellos que no cumplieron con las frecuencias alélicas esperadas de una típica segregación mendeliana. De los 372 *loci*, 83 *loci* (21,3%) presentaron distorsión en la segregación, de éstos fueron descartados 38 *loci* (9,7%) ya que presentaron desviaciones significativas de la segregación ( $p < 0.0005$ ), las cuales se evaluaron mediante la prueba de  $\chi^2$ . Los marcadores de la serie PM que se excluyeron por este criterio fueron: PM0319, PM0458 y PM0471 debido a que todos sus alelos se encontraron con elevados niveles de distorsión (Anexo 6).

Sin embargo, se conservaron los 45 *loci* restantes por presentar distorsión de segregación con niveles de significancia entre 0.005 y 0.1 ( $0.005 < p < 0.1$ ). Además, se encontraron 13 *loci* (3,3%) pertenecientes a los marcadores de la serie S que mostraron un patrón idéntico de segregación (valor de similaridad = 1,0), siendo excluidos a través del comando "*Identical loci*".

Se realizaron ensayos modificando el valor del LOD y considerando a 0,3 como el máximo valor de la frecuencia de recombinación. Al reducir el valor del LOD a 3 se incrementó el número de los grupos a 14, sin embargo al revisar cada uno de éstos se

pudo observar que algunos marcadores de la serie S fueron separados en distintos grupos llegando a formar diferentes grupos con un solo marcador, a pesar de haber sido ya reportados en un mismo cromosoma. Al incrementar el LOD a 5, se redujo el número de grupos de ligamiento, agrupando marcadores de diferentes cromosomas en un solo grupo de ligamiento. Por tanto, para la formación de los grupos de ligamiento se consideró un LOD de 4.0, debido a que con este valor de LOD se formaron los 12 grupos de ligamiento confirmado por la posición de los marcadores de la serie S.

Para la formación de los grupos de ligamiento se hizo uso del comando “*Create Groups for Mapping*”. El resultado fue la producción de 17 nodos en los cuales se encontraron distribuidos todos los microsatélites. Para la creación del mapa, se seleccionaron 12 de los 17 nodos, los 5 nodos restantes estuvieron conformados por 10 *loci* (2,6%) que fueron descartados debido a que no se encontraban ligados a ningún otro *loci* según el valor del LOD considerado (LOD=4,0).

La asignación a los grupos de ligamiento se da en base al análisis de dos puntos (por par de marcadores), sin embargo al realizar el análisis multipunto para la determinación del orden en cada grupo se encontraron 3 marcadores de la serie PM (PM0423, PM0436 y PM0449) que mostraron ligamiento insuficiente con otros marcadores del mismo grupo, siendo necesarios excluirllos del análisis.

Se lograron posicionar 87 marcadores (37 marcadores de la serie PM) a lo largo de los 12 grupos de ligamiento (Tabla 9). El número de marcadores por grupo de ligamiento varía desde 2 a 13 marcadores, siendo el grupo 9 (color morado) el que presentó sólo 2 marcadores posicionados (2%), mientras que el grupo 2 (color azul) presentó 13 marcadores posicionados (15%). En ninguno de los 12 grupos de ligamiento se reportan marcadores ubicados en la misma posición.



En cuanto a los 37 marcadores de la serie PM ubicados (Tabla 10), se puede observar que el patrón de distribución en los grupos de ligamiento fue diferente. El número de marcadores ubicados por grupo de ligamiento varió entre 2 y 6. En los grupos de ligamiento 2 y 3 (color amarillo y rojo) se encuentra el mayor porcentaje de marcadores PM posicionados (32%) en cada grupo se encuentran distribuidos la misma cantidad de marcadores, mientras que los grupos 1, 4, 5, 7 y 9 presentaron sólo 2 marcadores PM por grupo representando menor porcentaje de marcadores distribuidos (5% en cada uno).

Tabla 9. Distribución de los microsatélites (serie PM y S) en los 12 grupos de ligamiento construidos en el programa *JoinMap*.

	GL.1	GL.2	GL.3	GL.4	GL.5	GL.6	GL.7	GL.8	GL.9	GL.10	GL.11	GL.12
Marcadores	PM0331	PM0336	PM0333	PM0492	PM0459	PM0395	PM0417	PM0329	PM0442	PM0378	PM0382	PM0321
	PM0355	PM0360	PM0371	PM0495	PM0512	PM0489	PM0505	PM0439	PM0503	PM0385	PM0429	PM0365
	STG0006	PM0413	PM0380	STGBSS	STG0003	PM0520	STG0025	PM0451		PM0518	PM0531	PM0529
	STG0009	PM0473	PM0427	STI0003	STI0030	STG0001	STM0051	PM0478		STM3009	STI0043	PM0541
	STI0036	PM0522	PM0467	STI0022	STI0054	STI0028		STG0005			STM0040	STG0008
	STI0052	STG0011	STI0032	STM1004	STM0003	STM0037		STI0061			STM2020	STI0026
	STM2022	STG0015	STM0013	STM1016	STM0006			STM5119				STM3016
	STM5114	STI0002	STM5146	STM1056	STM0040			STM5126				STM5140
		STI0038		STM1057								
		STI0057		STM1104								
		STM1051		STM1105								
		STM1052		STwax1								
		STM5145										

Debido al uso de marcadores microsatélites con posición cromosómica conocida (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2008) se pudieron asignar los 12 grupos de ligamiento a los 12 cromosomas de papa (Tabla 10).

Entre las características de los grupos de ligamiento tenemos que el grupo 7 (cromosoma X, color celeste) se reporta como el grupo más pequeño al presentar una longitud de 37, 8 cM, mientras que el grupo 5 (cromosoma XII, color verde) presentó la mayor longitud (85,0 cM). En cuanto al número de marcadores por grupo, el grupo 9

(cromosoma III, color naranja) es el que representa al grupo con la menor cantidad de marcadores (2) y el grupo 2 (cromosoma IX, color amarillo) fue el que presentó la mayor cantidad de marcadores (13).

Además se reportan grupos de ligamiento con intervalos entre marcadores (*gaps*), por ejemplo: el grupo 10 (cromosoma VII, color morado) considerado el más largo presenta también la mayor distancia entre marcadores: 46,5 cM, seguido por el grupo 9 (cromosoma III, color naranja) el cual presenta sólo 2 marcadores con una distancia de 42,2 cM entre ellos, por otro lado el grupo 7 (color celeste) considerado el más pequeño también presenta el menor valor de espaciado entre marcadores (11cM) (Tabla 10).

Tabla 10. Características de los 12 grupos de ligamiento del mapa genético: longitud (cM), número de marcadores, mayor distancia entre marcadores (*gaps*).

Cromosoma	LG	Longitud (cM)	N° marcadores totales	N° marcadores serie PM	Mayor Distancia (cM)
I	11	48.1	6	3	37.9
II	1	63.8	8	2	26.9
III	9	24.2	2	2	42.2
IV	12	61.9	8	4	36.2
V	3	56.9	8	5	20.5
VI	8	44.7	8	4	12.6
VII	10	78.4	4	3	46.5
VIII	4	54.9	12	2	21.5
IX	2	70.8	13	5	34.8
X	7	37.8	4	2	11
XI	6	55.3	6	3	21.3
XII	5	85.0	8	2	29.8

En general, la longitud total del mapa es de 656,5 cM (Tabla 11), de los 87 marcadores que se encuentran distribuidos en este mapa se llegaron a ubicar 37 marcadores PM (37% de los 100 marcadores iniciales en prueba) considerándose un porcentaje alto en comparación con trabajos previos. Cabe resaltar que ambos tipos de marcadores (serie S

y PM) estuvieron representados en todos los grupos de ligamiento demostrando una buena distribución de las secuencias motivos de esos microsatélites en el genoma de la papa.

Tabla 11. Características globales del mapa genético de DM en base a marcadores microsatélites.

Longitud total del genoma mapeado	656,5 cM
Longitud media de la distancia entre marcadores	28,4 cM
N° total de marcadores	87
N° total de marcadores de la serie PM	37
N° medio de marcadores por grupo de ligamiento	7

cM: centiMorgan

Finalmente, el archivo generado por el *JoinMap* fue exportado al programa *MapChart* para la edición del mapa (Figuras 7: A y B).

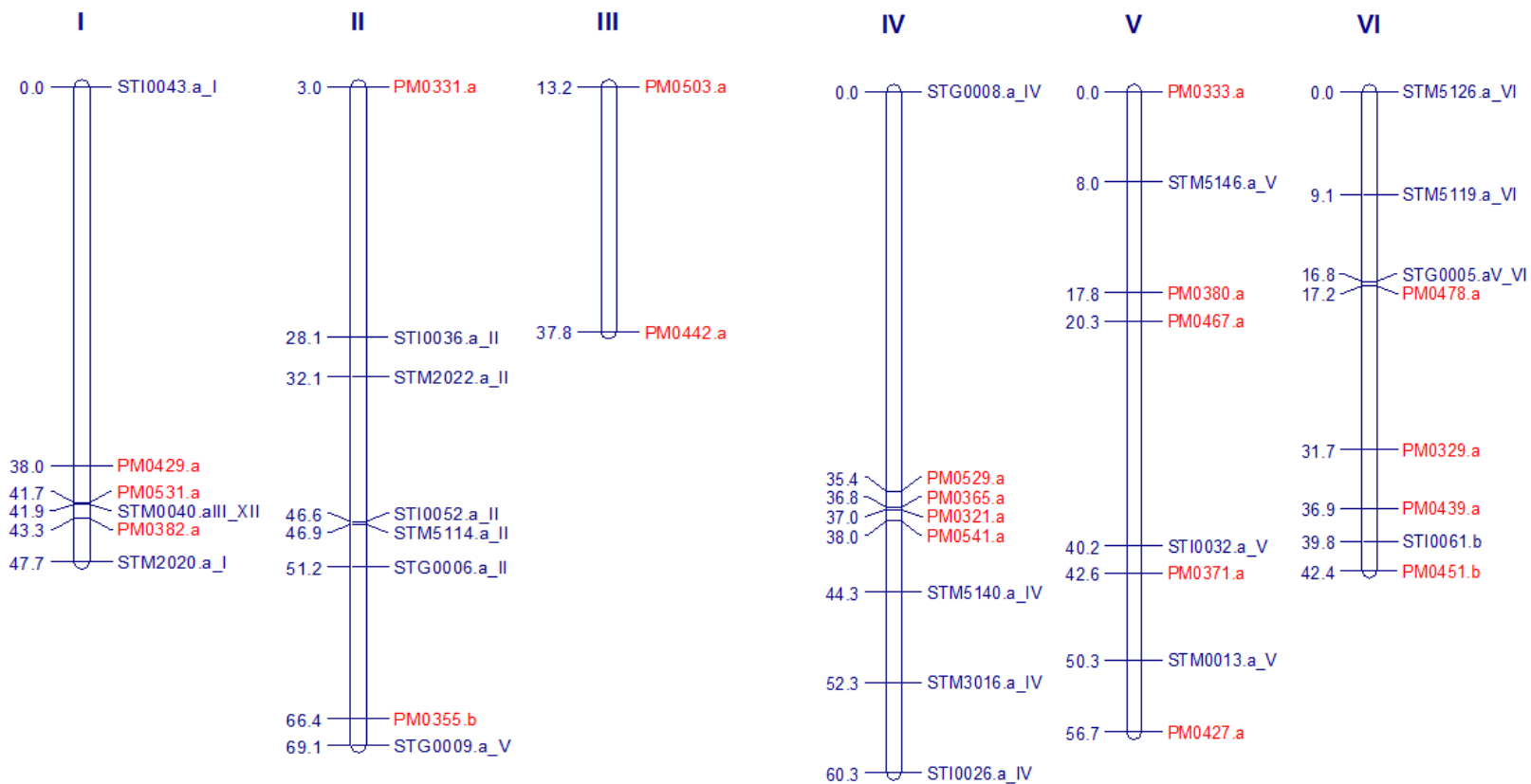


Figura 7. A) Mapa de ligamiento de la población de mapeo (DMxDI)xDI utilizando marcadores microsatélites (cromosomas del I al VI). Los marcadores se representan al lado derecho de cada grupo de ligamiento, mientras que los números a la izquierda indican la distancia genética de cada intervalo (cM). En rojo se presenta los marcadores de la serie PM y en azul se presentan los marcadores de la serie S mapeados anteriormente.

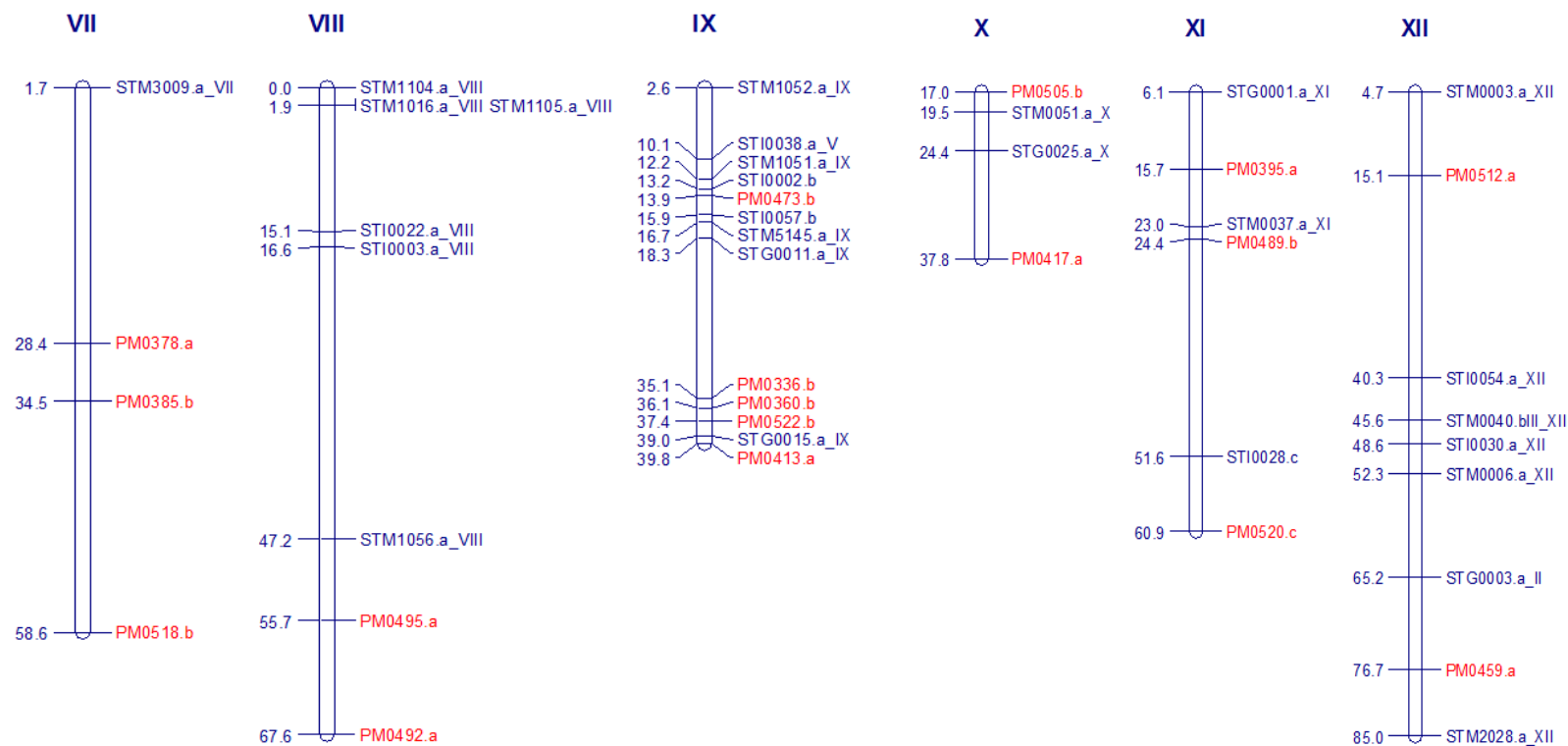


Figura 7. B) Mapa de ligamiento de la población de mapeo (DMxDI)xDI utilizando marcadores microsatélites (cromosomas del VII al XII). Los marcadores se representan al lado derecho de cada grupo de ligamiento, mientras que los números a la izquierda indican la distancia genética de cada intervalo (cM). En rojo se presenta los marcadores de la serie PM y en azul se presentan los marcadores de la serie S mapeados anteriormente.

## 6. Ubicación de los *super-scaffolds* en el mapa genético

A partir de los 37 microsatélites de la serie PM ya posicionados en los 12 cromosomas de la papa, se procedió a determinar los *super-scaffolds* que las contenían y a ubicar la posición cromosómica de los mismos (Tabla 12)

Tabla 12. Ubicación cromosómica del *super-scaffold* según la posición del marcador en el mapa.

CROMOSOMA	MARCADOR	SCAFFOLD_ID	CROMOSOMA	MARCADOR	SCAFFOLD_ID
I			VII		
	PM0429	PGSC0003DMB000000063		PM0378	PGSC0003DMB000000157
	PM0382	PGSC0003DMB000000030		PM0385	PGSC0003DMB000000058
	PM0531	PGSC0003DMB000000015		PM0518	PGSC0003DMB000000067
II			VIII		
	PM0331	PGSC0003DMB000000066		PM0495	PGSC0003DMB000000135
	PM0355	PGSC0003DMB000000012		PM0492	PGSC0003DMB000000070
III			IX		
	PM0503	PGSC0003DMB000000039		PM0473	PGSC0003DMB000000021
	PM0442	PGSC0003DMB000000154		PM0336	PGSC0003DMB000000253
IV				PM0360	PGSC0003DMB000000380
	PM0529	PGSC0003DMB000000016		PM0522	PGSC0003DMB000000203
	PM0365	PGSC0003DMB000000006		PM0413	PGSC0003DMB000000064
	PM0321	PGSC0003DMB000000019	X		
	PM0541	PGSC0003DMB000000182		PM0505	PGSC0003DMB000000587
V				PM0417	PGSC0003DMB000000421
	PM0333	PGSC0003DMB000000202	XI		
	PM0380	PGSC0003DMB000000003		PM0395	PGSC0003DMB000000131
	PM0467	PGSC0003DMB000000145		PM0489	PGSC0003DMB000000133
	PM0371	PGSC0003DMB000000051		PM0520	PGSC0003DMB000000017
	PM0427	PGSC0003DMB000000103	XII		
VI				PM0512	PGSC0003DMB000000034
	PM0478	PGSC0003DMB000000158		PM0459	PGSC0003DMB000000283
	PM0329	PGSC0003DMB000000075			
	PM0439	PGSC0003DMB000000044			
	PM0451	PGSC0003DMB000000005			

Ninguno de los marcadores estuvo ubicado en el mismo *super-scaffold*, permitiendo de esta manera posicionar el máximo número de *super-scaffold* (37).

## VI. DISCUSIÓN

Los microsatélites son un tipo de marcador ideal para la construcción de los mapas de ligamiento, debido a que presentan características ampliamente verificadas y documentadas, entre las que se encuentran su gran variabilidad, codominancia y su fácil aplicación.

Otra característica es la transferibilidad de los *loci* microsatélites entre distintas especies. Aprovechando esta característica, se hizo uso de 66 microsatélites (serie S) reportados previamente (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005 y Gishlain *et al.*, 2008), diseñados y ensayados en distintas poblaciones de papa. Estos marcadores amplificaron en su totalidad y resultaron ser polimórficos, evidenciando la tranferibilidad inter-específica de estos microsatélites (Gao *et al.*, 2003).

Durante el análisis de polimorfismo de los microsatélites, se reporta la presencia de un 6% de alelos nulos (genotipos en los que no se observó ninguna banda en el gel), siendo esta una de las principales desventajas del trabajo con microsatélites. Estos alelos nulos serían causados por la presencia de puntos de mutación o *indels* en uno o ambos sitios de complementariedad del *primer* diseñado impidiendo así la amplificación (Kwok *et al.*, 1990), otro de los motivos puede ser la baja cantidad y calidad del ADN molde pero según la cuantificación y análisis de la calidad del ADN se rechazaría este supuesto (Anexo 5), sin embargo cabe mencionar que la exposición a cambios constantes de temperatura debido al uso frecuente del ADN pudo ser un motivo de la degradación del ADN reduciendo así la calidad del material utilizado.

Se observó también la presencia de bandas de menor intensidad a las registradas como bandas principales (alelos verdaderos), éstas son conocidas como *stutter bands* o bandas tartamudas, las cuales serían subproductos de la amplificación originadas por la variación en las unidades de repetición con respecto al alelo verdadero.

El análisis de segregación de los *loci*, el ordenamiento de ellos y la construcción del mapa final puede convertirse en una tarea tediosa debido a los grandes volúmenes de marcadores trabajados durante los proyectos de mapeo. Por tanto es imprescindible hacer uso de programas que permitan facilitar esta tarea.

Uno de los programas más utilizados en proyectos de mapeo de vegetales es el *JoinMap*, su principal ventaja es que maneja los tipos más comunes de marcadores y poblaciones, incluyendo las poblaciones de polinización cruzada (población del presente trabajo) (Stam, 1993). Sin embargo, aunque existe un gran número de programas útiles para la construcción de mapas genéticos, aún no existe un programa ideal que cubra todas las necesidades de los proyectos de mapeo.

Para la construcción de un mapa genético, un punto importante para tomar en cuenta es el número de individuos que conforman la población de mapeo, un número elevado de los descendientes permite obtener estimaciones más precisas de las frecuencias de recombinación. Cuando el tamaño de la población es pequeño, una gran cantidad de marcadores quedan sin ligar; por tanto a medida que se incrementa el tamaño de la población, también se incrementa el número de marcadores ligados.

Binelli *et al.*, 1992, demostraron empíricamente lo mencionado anteriormente, pues con 40 individuos llegaron a formar 1 grupo de ligamiento conformado por 3 marcadores; al incrementar el número de individuos a 80, se formó también un sólo grupo de ligamiento pero con 5 marcadores y al incrementar el número de individuos a 149, el grupo de ligamiento estuvo conformado por 6 marcadores. El número de individuos (186) usados en el presente trabajo cae dentro del rango de individuos de poblaciones de mapeo de papa utilizados anteriormente (Tanksley *et al.*, 1992, Milbourne *et al.*, 1998, Yamanaka *et al.*, 2005).



Según Ky *et al.*, (2000), mientras mayor es la divergencia entre los parentales mayor es el número de *loci* que presentan distorsión de la segregación mendeliana, debido a que surgen problemas de apareamiento de los cromosomas homólogos de las especies lejanamente relacionadas durante la meiosis en el híbrido (Ky *et al.*, 2000). El tipo de población generada también es otro punto clave para la generación de la distorsión, poblaciones de tipo DH (Dobles Haploides) y RIL (Líneas Recombinantes Endogámicas) se caracterizan por presentar elevados porcentajes de distorsión, mientras que las poblaciones producto de retrocruzamiento presentan los porcentajes más bajos de marcadores distorsionados.

El bajo porcentaje de distorsión (21,3%) del presente trabajo se puede justificar por la cercanía evolutiva de los parentales utilizados y el tipo de la población generado a través del retrocruzamiento. La literatura reporta que las desviaciones de segregación en los marcadores podrían surgir por errores humanos como: errores de genotipificación, dificultad de identificación de bandas y sesgo estadístico (Plomion *et al.*, 1995) o por razones biológicas como eventos de reordenamiento cromosómico, genes incompatibles o emparejamiento no homólogo (Ky *et al.*, 2000); mientras que Ruiz y Asins (2003) aseveran que la presencia de factores recesivos letales y la preferencia de algunos alelos en la selección gamética serían posibles causas de la segregación distorsionada.

Lo más recomendable es el descarte de los marcadores distorsionados, sin embargo se debe tener en cuenta que si se rechazan todos los marcadores distorsionados, las regiones genómicas que incluyesen a estos genes quedarían sin mapear, perdiendo marcadores que podrían ser valiosos para programas de selección asistida por marcadores (MAS: *Marker Assisted Selection*). Considerando esta posibilidad, en el presente estudio, sólo se excluyeron del análisis de ligamiento a los marcadores que

se desviaron con un nivel de significancia hasta el 5%.

Los 10 *loci* que no resultaron ligados según el valor del LOD seleccionado (LOD=4,0), corresponderían a *loci* alejados en los extremos de los cromosomas que no llegaron a alcanzar la puntuación umbral para la detección significativa de ligamiento (Lander *et al.*, 1987).

Los grupos de ligamiento 7, 9 y 10 (Tabla 10) fueron los que presentaron el menor número de marcadores reportándose en ellos la presencia de grandes *gaps* entre pares de marcadores. Estas áreas cromosómicas con baja densidad de marcadores y elevado número de *gaps* se encuentran generalmente en la parte distal de los grupos de ligamiento (Hey *et al.*, 2004) y son conocidos como *hot-spots* (puntos calientes) o regiones con alta frecuencia de recombinación. Estas zonas también representarían regiones en las que no se encuentran los motivos de repeticiones de los microsatélites trabajados (Cervera *et al.*, 2001).

Por otro lado, las regiones con alta densidad de marcadores son identificadas como regiones con una baja frecuencia de recombinación (*cold-spots*), presentándose frecuentemente como *clusters* (grupos) alrededor de las regiones centroméricas en donde la recombinación está prácticamente suprimida (Tanksley *et al.*, 1992). También representarían regiones en donde se encuentra una elevada frecuencia de las secuencias repetitivas de los microsatélites, las cuales según la literatura (Lidner *et al.*, 2000) se localizan generalmente en las áreas pericentroméricas.

Para determinar la naturaleza de los *gaps* así como aumentar la densidad del mapa es necesario utilizar técnicas adicionales como las de los estudios citogenéticos (comparación de la distribución de los *gaps* con los patrones de Bandeado C) y utilización de otros marcadores como los AFLP que permitirían identificar nuevas

regiones no cubiertas por los microsatélites como son las regiones centroméricas.

Con los 37 marcadores incorporados al presente mapa genético, se superó el número de microsatélites cartografiados por Gishlain *et al.*, (2008) quien sólo logró incorporar 25 SSR. Sin embargo, al comparar con mapas reportados por Feingold *et al.*, (2005) y Milborune *et al.*, (1998), el presente mapa presenta una menor cantidad de marcadores incorporados.

Aunque la cantidad de marcadores posicionados en el presente trabajo no sea demasiada alta, cabe mencionar que estos microsatélites forman parte del set de 500 SSR diseñados por el PGSC, de los cuales 259 SSR (51,8%) lograron ser posicionados en el mapa final (PGSC, datos aún no publicados). Por tanto el presente trabajo ha contribuido con posicionar con el 14.29% de los microsatélites totales.

Además este mapa final estará integrado por otros marcadores como DARTs y SNPs, con los que se espera obtener la máxima cobertura del genoma de la papa y en un corto plazo identificar los *loci* que estén relacionados a caracteres cuantitativos (QTLs) para ser utilizados en los futuros programas de mejoramiento.

## VII. CONCLUSIONES

Se construyó un mapa de ligamiento basado netamente en microsatélites para la especie de *Solanum tuberosum* Grupo *Phureja* constituido por 12 grupos de ligamiento.

Se logró una elevada cobertura del mapa (656,5 cM) logrando incorporar 37 nuevos microsatélites al mapa genético de la papa.

Los 37 nuevos marcadores sirven como puntos de anclaje de los *super-scaffolds* asociados a ellos y permiten identificar la posición cromosómica de estos *super-scaffolds* en el mapa genético.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; and PADH, Harish. Advances in molecular techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Report*. 2008, vol. 27, p. 617-631.
2. BATESON, W.; SAUNDERS, ER.; and PUNNETT, R. Experimental studies in the physiology of heredity. *Reports to Evolution Committee of the Royal Society*. 1904. vol. 1, 160 p.
3. BINELLI, G.; GIANFRANCESCHI L.; TARAMINO G.; BUSO C.; STENHOUSE J. and OTTAVIANO E. Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theoretical and Applied Genetics*. 1992, vol. 84, p. 10-16
4. BONIERBALE, MW.; ROBERT, L.; PLAISTED RL. and TANKSLEY SD. RFLP Maps Based on a Common Set of Clones Reveal Modes of Chromosomal Evolution in potato and tomato. *Genetics*. 1988, vol. 120, n°. 4, p. 1095-1103.
5. BOTSTEIN, D.; WHITE, RL.; SKOLNICK, M. and DAVIS, RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980, vol. 32, p. 314-331
6. BRUFORD, Michael W. and WAYNE, Robert K. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1993, vol. 3, p. 939–943
7. CARNEIRO, Monalisa S. and VIEIRA, Maria L. RAPD - based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg*). *Genome*. 2003, vol. 45, p. 670–678
8. CERVERA, M.; STORME, V.; IVENS, B.; GUSMÃO, J.; LIU, B.; HOSTYN, V.; SLYCKEN JV.; MONTAGU MV. and BOERJAN W. Dense genetic linkage map of

- three *Populus* species (*P. deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*. 2001, vol. 158, p. 787-809
9. FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION), 2008. [Ref. de 23 de abril 2011]. Disponible en Internet: <http://www.potato2008.org/es/index.html>.
  10. FEINGOLD, S.; LLOYD, J.; NORERO, N.; BONIERBALE, M. and LORENZEN, J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005. vol. 111, n°. 3, p. 456–466.
  11. FERREIRA, Marcio E. and GRATTAPAGLIA, Darío. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2nd ed. Brasília:Embrapa, 1996. p. 220
  12. GAO, L.; TANG, J.; LI, H. and JIA J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding*. 2003. vol. 12, p. 245–261
  13. GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHABEL, U., WALKEMEIER, B. and UHRIG, H. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989, vol. 78, p. 65-75.
  14. GEBHARDT, C.; RITTER, E.; BARONE, A.; DEBENER, T.; WALKEMEIER, B.; SCHACHTSCHABEL, U.; KAUFMANN, H.; THOMPSON, R.; BONIERBALE, M. and GANAL, M. RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991, vol. 83, n°. 1, p. 49-57.
  15. GEBHARDT, Christiane. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *American Potato Journal*. 1994, vol. 71, p. 339-345
  16. GHISLAIN, M.; SPOONER, D.; RODRIGUEZ, F.; VILLAMON, F.; NUÑEZ, J.; VASQUEZ, C.; WAUGH, R. and BONIERBALE, M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004, vol. 108, p. 881-890.

17. GHISLAIN, M.; ANDRADE, D.; RODRÍGUEZ, F.; HIJMANS R. and SPOONER D.  
Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. *Phureja* Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006, vol. 113, n°. 8, p. 1515–1527
18. GHISLAIN, M.; NÚÑEZ, J.; HERRERA, M.; PIGNATARO, J.; GUZMÁN, F.; BONIERBALE, M. and SPOONER, D. M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*. 2008, vol. 23, n°. 3, p. 377-388.
19. GUTIERREZ, Raymundo. Papas nativas desafiando al cambio climático. Lima: Soluciones Prácticas. 2008. 82 p. ISBN: 987-9972-47-173-5
20. GUZMAN E., SHARMA K., SAGREDO B., MEJIA N., DI GENOVA A., BOLSER D., JACOBS J., THOMPSON S., FEINGOLD S., D'AMBROSSIO J., HERRERA M., BONIERBALE M., GHISLAIN M., MARTÍNEZ C., EGUILUZ M., LOZANO G., PONCE T., DE LA CRUZ L., BUELL R., DE BOER J., BRYAN G., ORJEDA F.  
Construcción y utilización de un mapa genético denso para anclar y organizar el genoma de la papa. En: XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa. Cuzco, Perú, 23-28 Mayo 2010.
21. HACKETT, C. and BROADFOOT, L. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. *Heredity*. 2003, vol. 90, p. 33-38.
22. HAWKES, Jhon. *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. London: Belhaven, 1990. 259 p. ISBN: 0-87474-465-2.
23. HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C. and WEGMAN, S. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology*. 1985, vol. 5, n° 2, p. 109-118
24. HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A. and NIENHUIS, J.  
Construction of linkage maps in maize and tomato using restriction fragment

- length polymorphisms. *Theoretical Applied Genetics*. 1986, vol. 72, n° 6, p. 761-769.
25. HERRERA, M. and GHISLAIN, M. *Molecular biology laboratory protocols: Plant Genotyping Training Manual*, 3rd ed. Lima: International Potato Center, 1999. 38 p.
  26. HEY, J.; WON, Y.; SIVASUNDAR, A.; NIELSEN, R. and MARKERT, A. Using nuclear haplotypes with microsatellites to study gene flow between recently separated populations. *Molecular Ecology*. 2004, vol.13, p. 909–919
  27. HUAMÁN, Zósimo and SPOONER, David M. Reclassification of Landrace Populations of Cultivated Potatoes (*Solanum* Sect. *Petota*). *American Journal of Botany*. 2002, vol. 89, n°6, p. 947-965.
  28. JACOBS, J.; ECK, H.; ARENS, P.; VERKERK-BAKKER, B.; LINTEL, B.; BASTIAANSEN, H.; EI-KHARBOTLY, A.; PEREIRA, A.; JACOBSEN, E. and STIEKEMA, W. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995, n°2, vol. 91, p. 289-300
  29. JONES, N.; OUGHAM, H. and THOMAS, H. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist*. 1997, vol. 137, p. 165-177
  30. KNAPP, S.J. Using molecular markers to map multiple quantitative trait loci: models for backcross, recombinant inbred and doubled haploid progeny. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991, vol.81, n° 3, p. 333-338
  31. KWOK, S.; KELLOGG, DE. McKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C. and SNINSKY, JJ. Effects of primer template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990, vol. 18, n° 4, p. 999 –1005.
  32. KY, CL.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2000, vol. 101, p. 669-676.



33. LANDER E., GREEN P., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M., LINCOLN S. and NEWBURG L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987, vol. 1, n° 2, p. 174–181.
34. LEWONTIN, Richard and HUBBY, Jack L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics*. 1966, vol. 54, p. 595-609
35. LIDNER, KR.; SEEB, JE.; HABICHT, C.; KNUDSEN, KL.; KRETSCHMER, E.; REEDY, DJ.; SPRUELL, P. and ALLENDORF FW. Gene-centromere mapping of 312 *loci* in pink salmon by half-tetrad analysis. *Genome*. 2000, vol. 43, n°3, p. 538-549.
36. LIU, Ben Hui. *Statistical Genomics: Linkage, mapping and QTL analysis*. 1st ed. New York: CRC Press, 1997. 648 p. ISBN: 0-8493-3166-8
37. MARKERT, Clement L. and MOLLER, Freddy. Multiple forms of enzymes: Tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1959, vol. 45, n° 5, p. 753-763
38. MCCONNELL, S.; BEYNON, C.; LEAMON, J. and SKIBINSKI, D. Microsatellite marker-based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. Niloticus* (Cichlidae); extensive linkage group segment homologies revealed. *Animal Genetics*. 2000, vol. 31, n° 3, p. 214-218.
39. MINAG. (Ministerio de Agricultura). 2011 [Citado 25-04-2011]. Disponible en <http://frenteweb.minag.gob.pe>
40. MILBOURNE, D.; MEYER, RC.; COLLINS, AJ.; RAMSAY LD.; GEBHARDT, C. and WAUGH, R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat *loci* in potato. *Molecular & General Genetics*. 1998, vol. 259, n°. 3, p. 233-245
41. MORTON, Newton E. Sequential tests for the detection of linkage. *The American Journal of Human Genetics*. 1995, vol. 7, n° 3, p. 277-318.

42. NAGY, I.; STÁGEL, A.; SASVÁRI, Z.; RÖDER, M. and GANAL, M. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*. 2007, vol. 50, n° 7, p. 668-88.
43. NCBI. (National Center for Biotechnology Information), 2011 [Ref. de 04 de mayo 2011]. Disponible en Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>.
44. OCHOA, Carlos. *Las papas de Sudamérica: Perú*. Kansas: Allen Press, 1999. 1036 p. ISBN: 9-2906-0197-3
45. Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe, 2012, [Ref. de 08 de octubre 2012]. Disponible en Web: <http://www.rlc.fao.org/>
46. PATERSON Andrew. *Genome mapping in plants*. 1st ed. Michigan: R.G. Landes Co, 1996. 330 p. ISBN: 0-12254-6590-4
47. PLOMION, C.; O'MALLEY, D. and DUREL, C. Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*): comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995, vol. 90, n°8, p. 1028–1034.
48. POWELL, W.; GORDON, C. and PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*. 1996, vol. 1, n°. 7, p. 215- 222.
49. RUIZ, C. and ASINS, MJ. Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003, vol. 106, p. 826–836
50. SCHUSTER Ivan and CRUZ Cosme D. *Estatística Genómica - Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados*. Brasil: Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 2004. 568 p. ISBN: 8-5726-9339-4
51. SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A. and NDJIONDJOP, N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5, n° 25, p. 2569-2587.
52. SPOONER, DM.; NÚÑEZ, J.; RODRÍGUEZ, F.; NAIK, PS. and GHISLAIN, M. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties

- and its implications for the origin of the early European potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005, vol. 110, n° 6, p. 1020–1026
53. STAM, Piet. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal*. 1993, vol. 3, n°5. 739-744 p.
  54. STAUB, J.; KUHNS, L.; GRUN, P. and MAY, B. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1982. vol. 107, p. 405-408
  55. STAUB, J.; SERQUEN, F. and GUPTA, M. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience*. 1996, vol. 31, p. 729-740.
  56. STEMSHORN, KC.; NOLTE, AW. and TAUTZ, D. A genetic map of *Cottus gobio* (Pisces, Teleostei) based on microsatellites can be linked to the physical map of *Tetraodon nigroviridis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 2005, vol. 18, n° 6, p. 1619-1624.
  57. STURTEVANT, Alfred H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*. 1913, vol. 14, p. 43–59
  58. SUKHOTU, Thitaporn and HOSAKA, Kazuyoshi. Origin and evolution of Andigena potatoes revealed by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome*. 2006, vol. 49, n° 6, p. 636-647.
  59. TANKSLEY, SD.; GANAL, MW.; PRINCE, JP.; DE VICENTE, MC.; BONIERBALE, MW.; BROUN, P.; FULTON, TM.; GIOVANNONI, JJ.; GRANDILLO, S.; MARTIN, GB.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.; MILLER, L.; PATERSON, A.; PINEDA, O.; RIIDER, M.; WING, R.; WU, W. and YOUNG, N. High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato. *Genome*. 1992, vol. 132, n°. 4, p. 1141-1160.
  60. VAN ECK, HJ.; ROUPPE VAN DER VOORT, J.; DRAAISTRA, J.; VAN ZANDVOORT, P.; VAN ENCKEVORT, E.; SEGERS, B.; PELEMAN, J.; JACOBSEN, E.; HELDER, J. and BAKKER, J. The inheritance and chromosomal

- localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*. 1995, vol. 1, n°. 4, p. 397-410.
61. VAN OOIJEN, Johan W. and MALIEPAARD, Chris. *JoinMap* 3.0 Software for the calculation of gentic linkage maps. Version 3. Wageningen: Plant Research International. 1996. [Ref. de enero de 2010]. Disponible en Web: <http://www.kyazma.nl/index.php/mc.JoinMap>
62. VAN OS, H.; ANDRZEJEWSKI, S.; BAKKER, E.; BARRENA, I.; BRYAN, G.; CAROMEL, B.; GHAREEB, B.; ISIDORE, E.; DE JONG, W.; VAN KOERT, P.; LEFEBVRE, V.; MILBOURNE, D.; RITTER, E.; VAN DER VOORT, J.; ROUSSELLE-BOURGEOIS, F.; VAN VLIET, J.; WAUGH, R.; VISSER, R.; BAKKER, J. and VAN ECK, HJ. Construction of a 10,000-Marker Ultradense Genetic Recombination Map of Potato: Providing a framework for Accelerated Gene Isolation and a Genome wide. *Physical Map. Genetics*. 2006, vol. 173, n°. 2, p. 1075–1087.
63. VASQUEZ, Victor. Mejoramiento genético de la papa. Lima: Amaru Editors, 1988. 208 p.
64. VISSER, R.; BACHEM, C.; DE BOER, J.; BRYAN, G.; CHAKRABATI, S.; FEINGOLD, S.; GROMADKA, R.; VAN HAM, R.; SANWEN HUANG, S.; JACOBS, J.; KUZNETSOV, B.; DE MELO, P.; MILBOURNE, D.; ORJEDA, G.; SAGREDO, B. and TANG, X. Sequencing the Potato Genome: Outline and First Results to come from the Elucidation of the Sequence of the World's Third Most Important Food Crop. *American Journal Potato Research*. 2009, vol. 86, n°. 6, p. 417–429
65. VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. and ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 1995, vol. 23, n° 21, p. 4407–4414.

66. WILLIAMS, JG.; KUBELIK, AR.; LIVAK, KJ.; RAFALSKI, JA. and TINGEY, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990, vol. 18, n° 22, p. 6531–6535.
67. YAMANAKA, S.; IKEDA, S.; IMAI, A.; LUAN, Y.; WATANABE, JA. and WATANABE, KN. Construction of integrated genetic map between various existing DNA markers and newly development P450-related PBA markers in diploid potato (*Solanum tuberosum*). *Breeding Science*. 2005, Vol. 55, n°. 2, p. 223-230.
68. YOUNG, W.; WHEELER, P.; CORYELL, V.; KEIM, P. and THORGAARD, G. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics*. 1998, vol. 148, p. 839-850.

## **IX. ANEXOS**

Anexo 1. Valores nutricionales para 100gr. de papa

<b>Valores nutricionales para 100 gr de papa</b>	
Agua	77,00 g
Fibra	1,80 g
Valor calórico	87 kcal
Proteína	1,87 g
Carbohidratos	20,13 g
Lípidos	0,10 g
Vitamina C	13 mg
Hierro	0,31 mg
Calcio	5 mg
Fósforo	44 mg

Fuente: Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe (2012)

Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/>

Anexo 2. Protocolo de Extracción de ADN (Herrera and Gishlain, 1999).

1. Se pesaron 100 mg de tejido de hoja (aproximadamente de 2 a 3 hojas), y se molieron en morteros preenfriados con nitrógeno líquido, hasta obtener un fino polvo.
2. El pulverizado fue transferido a tubos *eppendorf*, a cada tubo se le añadió 700 ul de buffer CTAB 2X, 2ul de mercaptoetanol y se mezclaron con la ayuda del vórtex. Se llevaron los tubos a baño maría a 65 °C durante 45 minutos, luego se mezclaron por inversión los tubos cada 15 minutos, dejándolos enfriar a temperatura ambiente.
3. A cada tubo se le añadió 700 ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) agitándolos suavemente para evitar dañar el ADN (invertir los tubos varias veces)
4. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 5 minutos, la fase acuosa fue separada en nuevos tubos (cuidando de no transferir material de la interfase)
5. Se añadieron 50 ul de CTAB 10X (en 0.7M NaCl) mezclándose suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.
6. Se repitieron los pasos 3 y 4.
7. Se añadió a cada tubo un volumen equitativo de isopropanol (4 °C ) entre 400-500ul y luego se invirtieron los tubos varias veces y se dejaron enfriar a 4 °C por 30 minutos.
8. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 20 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante, cuidando no perder el precipitado de ADN.
9. El precipitado fue lavado con 1 ml de EtOH 70% (por 3 minutos), se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos y se descartó el etanol con sumo cuidado. El precipitado es sometido a un segundo lavado en etanol al 90%, nuevamente se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 14000 rpm, y cuidadosamente se descartó el sobrenadante.



10. Se disolvió cada muestra de ADN en 150  $\mu$ l de TBE 1X o agua destilada luego se añadió 2  $\mu$ l de RNAsa libre de DNAsa (10mg/ml), los tubos se dejaron en la incubadora a 37°C por una hora.
11. Finalmente se guardaron las muestras a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

### Anexo 3. Preparación del gel de agarosa al 1%

1. Se pesó 1 gr de agarosa (Invitrogen), la cual se diluyó en 100 µl. de solución amortiguadora Tris Borato EDTA (TBE) 1X. Se calentó en un horno microondas hasta disolver totalmente la agarosa (1 minuto aproximadamente).
2. Disuelta la agarosa, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente (3-4 minutos aproximadamente), para luego agregar 2.5 µl de bromuro de etidio (BioRad), mezclar bien y verter esta solución en las cámaras de electroforesis (Agregar la solución de agarosa en el plato de agarosa evitando la formación de burbujas. Si se forman burbujas, se pueden remover usando *tips*).
3. Finalmente se dejó solidificar el gel a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos).

### Para cargar las muestras en los geles de agarosa

1. Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis conteniendo suficiente tampón TBE 1X hasta cubrir completamente el gel (aproximadamente 0.5 cm sobre el gel). Se cargaron cuidadosamente ~10 µl por muestra en su respectivo pocillo.
2. Se conectó el equipo de electroforesis, teniendo en cuenta la conexión de los electrodos: electrodos positivos (rojos) y negativos (negros), a los terminales correspondientes.
3. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: voltaje 150 voltios, 500 mA y entre 30 a 40 minutos aproximadamente.
4. Terminada la corrida se procedió a capturar la imagen de los geles en el transiluminador *Foto/Analyst Investigator* utilizando el programa *PCImage*.

#### Anexo 4. Preparación del gel de poliacrilamida

1. Este gel se preparó mezclando 20 ml del Gel Matrix KB Plus 6.5%, 150  $\mu$ l de Persulfato de Amonio (APS) al 10% y 15  $\mu$ l de TEMED.
2. La mezcla se colocó entre dos placas de vidrio, previamente lavadas, luego se colocó el peine de 25 mm de 48 pocillos formando una línea base y se dejó polimerizar horizontalmente por 45 minutos.
3. Se retiraron los sujetadores del peine y se lavó el exceso de acrilamida con agua corriente, luego con agua destilada y finalmente con OH al 70%.
4. Posteriormente se ensambló la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300, y para la corrida electroforética se utilizó el buffer TBE 1X KB *Plus* LI-COR.

Anexo 5. Cuantificación de ADN y evaluación de la calidad del ADN de hoja por espectrofotómetro (ND-1000)

N°	Código	ng/ul	260/280	260/230
1	DM	1686	2.02	2.23
2	DI	1351	2.02	2.14
3	DM/DI	1650	2.01	2.21
4	1	2157	2.01	2.2
5	2	670	2.04	2.06
6	3	2379	2	2.18
7	4	1721	2.02	2.12
8	5	1274	2.02	2.2
9	6	711	2.04	2.04
10	7	2843	2	2.18
11	8	2003	2.02	2.18
12	9	1500	2.03	2.07
13	10	1821	2.01	2.14
14	11	1400	2.03	2.18
15	12	908	2.02	1.96
16	13	1389	2.02	2.13
17	14	2132	2.02	2.19
18	15	813	2.02	2.01
19	16	1268	2.02	2.11
20	17	724	2.06	1.98
21	18	1247	2.04	2.12
22	19	1932	2.01	2.17
23	20	2362	2	2.19
24	21	1024	2.04	2.07
25	22	802	2	2.1
26	23	1001	2.03	2.16
27	24	482	1.98	2
28	25	693	2.05	2.05
29	26	831	2.03	2.06
30	27	923	2.04	2.16
31	28	831	2.02	2.08
32	29	1376	2.03	2.19
33	30	854	2.04	2.11
34	31	1387	2.01	2.14
35	32	1778	2.02	2.2
36	33	751	2.05	2.12
37	34	1154	2.05	2.17
38	35	1753	2.02	2.22
39	36	1076	2.01	2.14
40	37	1367	2.02	2.2

N°	Código	ng/ul	260/280	260/230
41	38	1189	2.02	2.14
42	39	752	2.02	1.99
43	40	1373	2.02	2.15
44	41	1439	2.03	2.16
45	42	1341	2.01	2.15
46	43	1416	2.02	2.13
47	44	1239	2.01	2.13
48	45	1411	2.01	2.17
49	46	1074	2.02	2.1
50	47	1241	2.01	2.11
51	48	1343	1.99	2.07
52	49	1127	2.04	2.13
53	50	894	2	2.08
54	51	850	2.02	2.06
55	52	799	1.99	2.03
56	53	874	2	2.1
57	54	1009	2.03	2.13
58	55	1176	2.02	2.17
59	56	1579	2	2.08
60	57	1107	2.01	1.95
61	58	1189	2.02	2.12
62	59	891	2.01	2.02
63	60	475	1.97	1.98
64	61	659	2.02	1.99
65	62	1005	2.01	2.09
66	63	1038	2.01	2.15
67	64	720	2.01	2.09
68	65	1316	2.01	2.14
69	66	1688	2	2.11
70	67	1269	1.98	2.11
71	68	622	1.99	2.01
72	69	1229	2.01	2.18
73	70	1579	2	2.22
74	71	941	2.01	2.12
75	72	1202	1.99	2.13
76	73	1238	1.97	2.15
77	74	1414	2.02	2.18
78	75	1632	2.01	2.22
79	76	1894	2	2.21
80	77	1900	2	2.25

N°	Código	ng/ul	260/280	260/230
81	78	1619	2	2.25
82	79	1649	2	2.23
83	80	1126	2.01	2.22
84	81	1435	2.02	2.23
85	82	1261	1.98	2.21
86	83	1254	2.03	2.23
87	84	1174	2.03	2.21
88	85	970	2.02	2.15
89	86	825	2.03	2.1
90	87	2334	2	2.25
91	88	1409	2.02	2.2
92	89	1699	2	2.24
93	90	1666	2.02	2.25
94	91	1585	2.03	2.24
95	92	1628	2.02	2.23
96	93	851	2.03	2.14
97	DM	1713.2	2.01	2.29
98	DI	2919.8	2	2.32
99	DM/DI	2347.1	2.01	2.34
100	94	1989.1	2	2.36
101	95	1517.6	2.02	2.34
102	96	2050.2	2.01	2.33
103	97	2432	2.01	2.34
104	98	1750	2.03	2.34
105	99	2246.4	2.01	2.34
106	100	2714.7	1.99	2.34
107	101	1955.7	2	2.26
108	102	2785.7	2	2.3
109	103	1937.6	2.01	2.3
110	104	1682.2	2.01	2.34
111	105	2781.8	2	2.31
112	106	2220.6	2.01	2.32
113	107	2010.8	2.01	2.34
114	108	2082.4	2.01	2.35
115	109	1800.8	2	2.28
116	110	2401.9	2	2.35
117	111	2047.4	2.02	2.36
118	112	2223.7	2.02	2.34
119	113	2374.9	2	2.33
120	114	2196.5	2.01	2.34

N°	Código	ng/ul	260/280	260/230
121	115	2917.1	1.98	2.3
122	116	2596.9	2.01	2.36
123	117	2060.1	2.02	2.34
124	118	2404	2.02	2.32
125	119	2395.5	2.02	2.28
126	120	1981.4	2.03	2.32
127	121	2107.3	2.01	2.33
128	122	3178.7	1.98	2.26
129	123	2182.1	2.01	2.31
130	124	2131.4	2.02	2.31
131	125	2333.6	2.02	2.31
132	126	2505.1	2.01	2.27
133	127	2127.7	2.03	2.33
134	128	2049.2	2.03	2.29
135	129	2388.6	2.01	2.3
136	130	3905.9	1.93	2.21
137	131	2745.9	2	2.28
138	132	2268.2	2	2.3
139	133	2055.7	2.01	2.23
140	134	2005.7	2.02	2.33
141	135	1792.5	2.02	2.29
142	136	2527.2	1.99	2.21
143	137	2686.6	1.99	2.25
144	138	2626.2	2	2.31
145	139	2398.3	2.01	2.21
146	140	1900.5	2.01	2.22
147	141	1756.1	2.02	2.23
148	142	1981.3	2.03	2.31
149	143	1563.3	2.02	2.31
150	144	2162.2	2	2.31
151	145	1806.4	2.03	2.32
152	146	2818.8	2	2.29
153	147	1866.7	2.01	2.35
154	148	1528.5	2.01	2.33
155	149	1513	2.01	2.38
156	150	2188.2	2.02	2.33
157	151	1573.4	2.01	2.31
158	152	1762.5	2.02	2.32
159	153	1915.3	2.01	2.33
160	154	2121.5	2.02	2.34

N°	Código	ng/ul	260/280	260/230
161	155	1806.4	1.99	2.34
162	156	1494.5	2	2.36
163	157	1377.2	2.02	2.3
164	158	1296.7	2	2.34
165	159	1108.7	2	2.33
166	160	1148.5	2.02	2.35
167	161	1431.1	1.99	2.34
168	162	1302.7	2.01	2.4
169	163	1312.9	2	2.34
170	164	1305.8	2.02	2.32
171	165	1049.4	2.03	2.34
172	166	1017.6	2.01	2.31
173	167	716.19	1.97	2.31
174	168	1846.3	2	2.33
175	169	1286	2.03	2.27
176	170	1579.9	2	2.32
177	171	1282.5	2.01	2.32
178	172	1675.3	1.99	2.27
179	173	1331.6	2.02	2.33
180	174	1412.2	2	2.31
181	175	1727.8	2.01	2.35
182	176	1984.1	2	2.32
183	177	1490.1	1.99	2.3
184	178	1523.7	2	2.33
185	179	1293.3	2.02	2.3
186	180	1275.1	2.02	2.31

Anexo 6. Marcadores microsatélites excluidos por su alto nivel de distorsión

<i>Loci</i>	Tipo de segregación	k-	hh	ll	lm	nn	np	perdidos	Nivel de Distorsión	
STI0028.a	<hkxhk>	33	131	0	0	0	0	5	*****	[hh:hk:kk]
STM1105.a	<hkxhk>	29	138	0	0	0	0	2	*****	[hh:hk:kk]
STG0005.a_VI	<hkxhk>	0	163	0	0	0	0	6	*****	[hh+hk+h-:kk]
PM0471.a	<hkxhk>	48	121	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
PM0471.b	<hkxhk>	40	129	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
PM0492.c1	<hkxhk>	43	114	0	0	0	0	12	*****	[hh:hk:kk]
STI0012.b_IV	<hkxhk>	14	149	0	0	0	0	6	*****	[hh+hk+h-:kk]
PM0319.b	<hkxhk>	46	122	0	0	0	0	1	*****	[hh:hk:kk]
PM0319.a	<hkxhk>	32	136	0	0	0	0	1	*****	[hh:hk:kk]
STG0020.b_IV	<nnxnp>	0	0	0	0	54	114	1	*****	[nn:np]
STI0043.c_I	<nnxnp>	0	0	0	0	12	148	9	*****	[nn:np]
STI0050.a	<hkxhk>	58	111	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
STI0049.b	<hkxhk>	36	131	0	0	0	0	2	*****	[hh:hk:kk]
STI0043.b_I	<hkxhk>	79	78	0	0	0	0	12	*****	[hh+hk+h-:kk]
STI0019.a	<hkxhk>	31	138	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
STM2020.a_I	<nnxnp>	0	0	0	0	17	148	4	*****	[nn:np]
STI0055.b	<nnxnp>	0	0	0	0	41	125	3	*****	[nn:np]
STI0043.b_I	<hkxhk>	83	77	0	0	0	0	9	*****	[hh+hk+h-:kk]
PM0541.b	<hkxhk>	57	88	0	0	0	0	24	*****	[hh+hk+h-:kk]
PM0321.b	<nnxnp>	0	0	0	0	42	116	11	*****	[nn:np]
PM0365.c	<nnxnp>	0	0	0	0	44	125	0	*****	[nn:np]

<i>Loci</i>	Tipo de segregación	k-	hh	ll	lm	nn	np	perdidos	Nivel de Distorsión	
STM2020.b_I	<hkxhk>	83	80	0	0	0	0	6	*****	[hh+hk+h-:kk]
STI0049.a	<hkxhk>	46	121	0	0	0	0	2	*****	[hh:hk:kk]
STI0052.b_II	<hkxhk>	5	156	0	0	0	0	8	*****	[hh+hk+h-:kk]
STI0050.b	<hkxhk>	33	136	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
STM1105.b	<hkxhk>	57	110	0	0	0	0	2	*****	[hh:hk:kk]
PM0449.b	<hkxhk>	47	119	0	0	0	0	3	*****	[hh:hk:kk]
PM0492.c2	<hkxhk>	43	114	0	0	0	0	12	*****	[hh:hk:kk]
PM0458.b	<hkxhk>	68	91	0	0	0	0	10	*****	[hh:hk:kk]
PM0520.a	<hkxhk>	32	137	0	0	0	0	0	*****	[hh:hk:kk]
PM0541.c	<nnxnp>	0	0	0	0	38	107	24	*****	[nn:np]
PM0458.a	<nnxnp>	0	0	0	0	46	123	0	*****	[nn:np]
STG0003.b_II	<lmxll>	0	0	34	131	0	0	4	*****	[ll:lm]
PM0413.b	<hkxhk>	49	119	0	0	0	0	1	*****	[hh:hk:kk]
PM0321.c	<hkxhk>	59	99	0	0	0	0	11	*****	[hh+hk+h-:kk]
STM3016.b_IV	<hkxhk>	63	106	0	0	0	0	0	*****	[hh+hk+h-:kk]
STM1004.b_VII	<hkxhk>	21	143	0	0	0	0	5	*****	[hh+hk+h-:kk]
STI0001.197_IV	<nnxnp>	0	0	0	0	106	63	0	*****	[nn:np]



Anexo 7. Secuencias de los 100 marcadores microsatélites de la serie “PM”, motivos de repetición, tamaño del motivo, tipo de amplificación, temperatura de *annealing* (Ta), tipo de polimorfismo, número de alelos, tamaño del producto, ubicación en el mapa según grupo de ligamiento (G.L.)

Marcador	Forward Primer	Reverse Primer	Motivo	Tamaño del motivo	Amplificación	Ta (°C)	Polimorfismo	# de alelos	Rango tamaño producto (pb)	Ubicación en el mapa (G.L.)
PM0297	TTCTTGCTTGGTAGATTGCATTAGAA	TTTTGAGGGGCAATTGAGTCTTTA	AT(2*11)	26	SI	60	Monomórfico	1	-	-
PM0302	GTAGGAAGTTAGGTATGGACCGCC	TCGATTAGTGTTGCAGGAGTGTGT	TA(2*12)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0304	TGCCTTAATGAGATAGCTTTTGGC	GGATTGGCTGTATGCCTTAATGAG	AT(2*13)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0307	CCAACACTTTTCGTTGTCTTCTCT	TAAATTCACCAACCCGGTATCACT	TA(2*11)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0310	ACACGAACAGTCCAAGACATCAAT	TGACTTGAGAGTTTGTGTGGTTGA	TA(2*15)	28	SI	60	Monomórfico	1	-	-
PM0314	AATGCTAACTCAATAGGTGCAAAAA	TGTTTTCAAATGAAACATAGTGAGTGA	AT(2*12)	20	NO	-	-	-	-	-
PM0317	TGTTATATTGATCTTGTGTTTTGAATGA	CTGCATTTGTGTTGATTATAATGTGA	AT(2*11)	24	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0319	TTTCAATCTATCACAGGATACAACACG	TGGACTAAAGAGCGTCTGAATCAGTAT	AT(2*11)	24	SI	50	Polimorfismo	2	135-163	N.D.
PM0321	TGGCGATAAATACATGAGTTCCT	TCACAATCCTTCAATGTAAAAAGGTG	TTC(3*9)	27	SI	58	Polimorfismo	3	201-222	12
PM0323	AAGGGATAAAAGTGTTAACTCCGA	TTTGGTTTTCTGGTTTGATTTTGG	TA(2*13)	20	SI	60	Monomórfico	1	-	-
PM0325	AGAGGAACCCTCTCAATTTTCCAC	ACCGAGTTTAGAAGGCTGTGATTG	TCT(3*7)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0327	TATTGCTATCTTAGTTCGCTGCCC	AATATGACTAAACCCATAAGCGAAGC	AT(2*11)	24	SI	60	Monomórfico	1	-	-
PM0329	TGTACCCTTATGTGTATGCCTTATCC	CCACGTAGGCTATCCTAGGGTTCT	TA(2*13)	26	SI	58	Polimorfismo	2	137-147	8
PM0331	TGGTGGTTGTTGGTTAGAGAACTT	TGGGATTTGAGTTGACTGAATTGTT	TA(2*16)	22	SI	58	Polimorfismo	3	161-171	1
PM0333	GGGTGGGGTATTTAAAACACGATA	TGGTCCTAACTCCACAACACTTCA	AT(2*11)	22	SI	58	Polimorfismo	3	206-219	3
PM0336	GCATATGCTTAGGGCGCTCAATA	ATACATGGAGTCCAGGGGTTTCATC	AT(2*11)	26	SI	60	Polimorfismo	2	136-139	2
PM0338	TGCATCTTTCATTGTTGCTCTATCC	TTTGGAAGTATGGAACATAAGCA	AGTTG(5*4)	28	SI	55	Monomórfico	1	-	-
PM0342	TTTTTCAATTTGTATCTTGGCATGT	ATTCCTGCCCTCTTATTCTTTTT	AT(2*12)	26	SI	49	Monomórfico	1	-	-
PM0344	TCCTTCATTTCTTCGTTGTTTTCT	AAATCACTCCTTTGCTCAATATTTCTC	TA(2*12)	30	SI	60	Monomórfico	1	-	-
PM0346	TGGAAATACATGCATATTCTAATCACA	CTTATCTTTCAAGCCCAAGATCG	TA(2*12)	24	SI	55	Monomórfico	-	-	-
PM0348	GGCGAACTCTTCATGTCTTGAAC	TGTGCTTGTGTACCTATATTTGAGTGA	AAT(3*11)	24	SI	52	Monomórfico	1	-	-
PM0353	TCCTATTTCAATTTGAGGGGTGTT	TGTGAGGATGTTGGTACACTTGGT	AG(2*10)	20	SI	55	Monomórfico	1	-	-

Marcador	Forward Primer	Reverse Primer	Motivo	Tamaño del motivo	Amplificación	Ta (°C)	Polimorfismo	# de alelos	Rango tamaño producto (pb)	Ubicación en el mapa (G.L.)
PM0355	TCGAAATACTATCACGGACCAACA	TGACATCAACTCACGTTCACTATCTTT	AT(2*15)	33	SI	55	Polimorfismo	2	225-234	1
PM0357	GAACGGTAATGAGCATGCAAGATA	TGGTCATTGCATTTAGTTTAGTCTTCAG	AT(2*12)	20	SI	60	Monomórfico	-	-	-
PM0360	TCCCCAAATTTTACTTTGAAACAAG	TTATTTTCATGCCACAAAGTAGCG	TA(2*10)	24	SI	50	Polimorfismo	2	128-130	2
PM0362	GTGAAACGGCATGTCCTTAATTCT	TTCCTCTAGGGACAACATGGAAAA	ATT(3*7)	24	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0364	TGCATCCCTGTCTATTAAGCATGT	TCGAGATGCAATGTTAAATCAAGC	AAAG(4*5)	27	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0365	CTTGATCTATGACTGGGCGGA	TGGTGAAACTCTTAATTAGTGGTAAGA	TAT(3*24)	22	SI	58	Polimorfismo	3	135-144	12
PM0367	GCCTAAAAGCTACTCCACAATCC	TGAGAATAACCTTTCACCGTCCAT	TA(2*16)	28	NO	-	-	-	-	-
PM0371	GCATGCACATGATGTAACAACAAC	CCCCAAAACAGAAAATGAAAGATT	TA(2*12)	24	SI	60	Polimorfismo	2	173-190	3
PM0373	TTGAGGGGTAGTAAAATTGGAAAAA	CACCATGTTTCTGTGTCAACATGA	AT(2*11)	26	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0376	CTTCTAAGAGGTGCCACATCAGTG	CCCAAAATTTGAGGAGACTCATTT	TA(2*13)	54	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0378	AACCTTTTCTTATTGGTTTGC GA	CTACTCTTCCAGCAAAAGCAAAG	AT(2*10)	26	SI	58	Polimorfismo	3	154-164	10
PM0380	TGGTTTACTCAGTGGTCTATATCAGCA	CCCAGCAATGTATTACTTTTTGCC	AT(2*11)	24	SI	42	Polimorfismo	3	171-180	3
PM0382	GAGCTTGATTCTCAACCCTACCT	TTCAAGTCATTAACCACCCCATTT	CTT(3*9)	20	SI	50	Polimorfismo	3	142-180	11
PM0385	TGCAAGTTTCCAATTTACCCATTT	CGGTAAGGATTTTGCTATCTACGTG	TTC(3*9)	28	SI	55	Polimorfismo	2	196-198	10
PM0388	GACTTTTCTTGAAGCCCTAGCTGA	AAACACCCAAATATTCGCCAAAGT	CTC(3*7)	28	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0395	CAAAAATAAACAAATTCCTTTTTCCC	TTTTTGGTACAAATTTTGTATGTGTTT	AT(2*13)	24	SI	50	Polimorfismo	2	118-122	6
PM0397	TGACGAATTAAATAAAGACATACGGCA	TTATATTATTGGGCCCGTGCATAG	TA(2*11)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0399	CCCTCCTGTTTGGAACTCATTTTTT	ACCAAATCATGCACTTCCACTTTT	TG(2*12)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0404	CTCTAACGAGGGAGGGAGTACCAT	TCCACCAATCTAGCTGATGTTCAA	TG(2*13)	22	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0406	TTTCCGAAACCTTTGGTCTTCATA	TGGAAGAACCTAGGCAATTTCTTG	TA(2*11)	32	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0408	CTAGATCCCATTGTTGTGTCATCA	TCCTACCCATACCTCTATGGTTCTTG	TA(2*10)	48	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0410	CTTAATTAAGCCCTCACCAAGC	AGGAGAAGGAGAAGGAGAAGGAGA	CTC(3*10)	22	NO	-	-	-	-	-

Marcador	Forward Primer	Reverse Primer	Motivo	Tamaño del motivo	Amplificación	Ta (°C)	Polimorfismo	# de alelos	Rango tamaño producto (pb)	Ubicación en el mapa (G.L.)
PM0413	TGGTGGTAAATTATATACATGGCAAAT	GCTTTTCTTTTCACTTACTCTTGCC	TA(2*13)	26	SI	50	Polimorfismo	2	174-176	2
PM0415	TGACACCATATTTCACTTACACACTTCA	TCTTCACCCCGCTTATTTGATG	TA(2*11)	36	NO	-	-	-	-	-
PM0417	AAACATAATCATCGTGAAAGGCAA	AAAAATCGAAAGAACCAAATTTCTCT	TA(2*15)	28	SI	50	Polimorfismo	2	160-163	7
PM0420	CTGTGTCAGTAACGAAATGTGCAA	CCTCCTGCTCTCTATCTCTCCCTC	TG(2*14)	44	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0423	ACGAAGTGTTCAAATCTCCAGACC	TTGGAGAAGACTGGCGTAGGTTTA	CT(2*15)	22	SI	60	Polimorfismo	2	116-132	N.D.
PM0427	CCACGTGATATGTTTAAACCACAA	TCAAGTGCTAGACATGAAATCTCCA	TA(2*12)	26	SI	50	Polimorfismo	2	223-232	3
PM0429	CAGATATCAGTTAAGTATTTGAACCCCC	GAGGGTAAACGGGAAGGAAAAA	CA(2*13)	28	SI	55	Polimorfismo	3	147-156	11
PM0431	CCCCTTGTTAAGGAATATCCGTCT	TTTGGTGGAATAACCCAACAGACT	AT(2*12)	28	NO	-	-	-	-	-
PM0434	CCTTCTTGAAAATGAAGGAGGTTG	GCCAAGATTCACCTCAACTTTGGTT	TA(2*12)	26	SI	55	Monomórfico	1	-	-
PM0436	CTCCTCTTATCCCAAAGTTTCCC	TGTTAGTTCTTGTGGCAATTGAA	AT(2*17)	27	SI	55	Polimorfismo	3	201-278	N.D.
PM0439	AACAACCACAATACCCCAATCAAG	ACAATTGCTTATTTTGTGGGTGG	AT(2*10)	20	SI	57	Polimorfismo	2	172-176	8
PM0442	CACAAATTGACCAAGCGTAGAAGA	CAAGATGCTGTCAGGTTCTGTTTG	AT(2*13)	24	SI	57	Polimorfismo	2	179-192	9
PM0445	TTGTATTGGTATCATTAAGGCGGA	TTAAAGTGAATTGTGACGGTTTCG	TA(2*18)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0447	GATTATGCACGACTTTGAAAACA	TCCTTCCAATATTTCAATATGTATGTGT	TA(2*14)	30	NO	-	-	-	-	-
PM0449	AAAATTTTCATCTTCTTCTGTAAAGTG	TGCATTGGTTATATGAATTATTGATTG	TA(2*10)	22	SI	50	Polimorfismo	2	187-191	N.D.
PM0451	ATCTATGGAAGGTCAATGGCTTCA	TCGTGTGCATATGTTTGATCACTG	TC(2*17)	21	SI	60	Polimorfismo	2	169-196	8
PM0454	ATCTATGGAAGGTCAATGGCTTCA	TCGTGTGCATATGTTTGATCACTG	AT(2*15)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0456	TTGGTAAATCATTAACATCCAACGA	AATCGTAACGAATAATTTGGGAAG	AT(2*29)	28	NO	-	-	-	-	-
PM0458	GCCCCCTTTCTCTTCTCTAATTTTC	GAGAGGAGAACGAAGAAGGTGGAT	CTCTC(5*4)	32	SI	60	Polimorfismo	2	123-127	N.D.
PM0459	TGCTAGCACAGTTATTCTAGGGCT	TGGGATCTTGGATTGTATTGATT	TA(2*11)	30	SI	58	Polimorfismo	1	195	5
PM0461	GGACCAACAATGATTCTCGAGTG	GCGCTTATTCGAGAAGGGTAATTT	ACAT(4*5)	26	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0462	TGGGCCTAAGAAGAGGATAAGTAGA	TTTTTCTCGTGTGAGGGATATATGA	AT(2*11)	48	NO	-	-	-	-	-
PM0464	TTGAACTGAAGATAGGTGTTGGGA	GGGATTTCACTCCTAGTGGGATTT	CAA(3*10)	22	SI	50	Monomórfico	-	-	-

Marcador	Forward Primer	Reverse Primer	Motivo	Tamaño del motivo	Amplificación	Ta (°C)	Polimorfismo	# de alelos	Rango tamaño producto (pb)	Ubicación en el mapa (G.L.)
PM0467	TTCTCTGTTCTTATAATGAAGGGGATT	TGCATCTTAAGTCATCAAAAATACAAAA	AT(2*10)	34	SI	58	Polimorfismo	3	133-159	3
PM0469	CACACACCCCTTAGTCTTTTCCAAAC	GGAGCTCCTTCAATTGATTTTCGTA	AT(2*11)	20	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0471	GACAGATGAAAAACAACCTTGTC	TCCAACCTCATCCAATTTTATCAAG	GT(2*12)	24	SI	50	Polimorfismo	2	154-168	N.D.
PM0473	AAGGTGCAAATGGAGCAAAAATAC	CCCTGGTGATTTCTCAGTTCTAAAAG	AT(2*14)	34	SI	50	Polimorfismo	2	177-183	2
PM0475	ATCTCCCAATCTCTCCCTATCTCC	TCTACGATGATTGACTCCAACCAA	TC(2*14)	26	SI	55	Monomórfico	1	-	-
PM0478	AAAGTTGAGACCAGAAGCCATTTG	AATCTTGCAACTGCTGACACAGTAA	AG(2*12)	28	SI	58	Polimorfismo	3	162-172	8
PM0483	TAGAGGTTTCGAGTGTTGTTTCGAC	AACCCGAAATGACCAAAATATCAA	TA(2*10)	22	NO	-	-	-	-	-
PM0485	TCAAGATTAGCTTCTGGGTTGAG	ATATATGATGAGCCAGATAAGAAATGC	AT(2*13)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0487	CCGAATGGCCCAAACCTCATT	CTTCACTTGAAGCCTATATCGTGTTC	TC(2*16)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0489	CAACTTTTCTATTCTTCGTCACATCA	TCATGCACATTACCATATCAACAA	AT(2*13)	22	SI	50	Polimorfismo	2	177-186	6
PM0492	TTTTTGAAAAATTTGGGACAAGTTCA	AAGTGTTTGAGTCAAGGAAGGCAC	TA(2*12)	20	SI	50	Polimorfismo	7	242-271	4
PM0493	TCTAATGTCTAAACCTTGCAATTCTTG	GAACCAGGGAGACCAGACAGAATA	AT(2*12)	21	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0495	CACAAAACTGACCAACAATTGGA	CTACTAACCTCCTCCCTCACACCA	AAAAT(5*5)	20	SI	60	Polimorfismo	2	135-138	4
PM0497	ACAAGAGCTGGGACTCAACAATTT	AAGACGACTTACACCCCAAGACTAA	AT(2*11)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0503	GTTCTTCTGATGTCTTGTGGGATAAG	CTCGAATACCTTCGTTTCGTAATCC	AT(2*14)	22	SI	60	Polimorfismo	3	164-216	9
PM0505	TCATCATTGTGTAAACAAAAAGAACAAT	TGCAATAATTTTAATTGATGGCTTATTA	AAT(3*9)	22	SI	60	Polimorfismo	4	191-211	7
PM0507	TGGTTACTCTGTCATGGCATTATTTT	GGAATATGTTCTCATAAAACCCCTTGG	TAGGC(5*4)	22	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0510	ATTTTAAGACCCCAAAACAACCC	CATACCTTGATTCAAAGCCCTCAC	AGA(3*11)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0512	CATTTGTTTCATGGTGCTCTATGCT	GACAGACCTACATAGAGTTTCGCCG	AT(2*13)	26	SI	60	Polimorfismo	3	141-153	5
PM0515	GACAGTCGATAGTTCAAGATGAAA	TCAATTAAGCCCAGTGAAAACTG	AT(2*12)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0518	TGTAATGCATGGTTTGATATTCACG	AAGTGTTGGTCAAAGTCCATATCATTT	TA(2*11)	26	SI	50	Polimorfismo	2	154-162	10
PM0520	CAGGACCAAAACAAAACCTTACCCA	TTATGAGGCACCAAATTCATCTCA	AT(2*10)	30	SI	50	Polimorfismo	3	195-220	6

Marcador	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	Motivo	Tamaño del motivo	Amplificación	Ta (°C)	Polimorfismo	# de alelos	Rango tamaño producto (pb)	Ubicación en el mapa (G.L.)
PM0522	TGTTCTAATTCCTTTGCCACGAT	TGTGCTCATGGATTGTCTTTCATT	ACA(3*8)	22	SI	60	Polimorfismo	2	132-143	2
PM0525	AGACATAACTGTCTTCTTTGCATCACA	ATTGCTAGCATTGGTCGGGTAT	AT(2*11)	26	NO	-	-	-	-	-
PM0527	CGAAAAATCACAACCCGTTAAAAA	TTTCACGTAGATGTTATGACCCCTC	TA(2*13)	20	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0529	TCTTTGCCAACTTTTCACAATTTTT	TTTATTTTCCACTTCCGTGCAAT	AGA(3*7)	24	SI	60	Polimorfismo	2	162-170	12
PM0530	CATCAAATTTTCTGGTGGGTATGAA	GCACGGGCAAGAACCATCTA	TA(2*10)	24	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0531	TTCTTTTGGTTTTGCATTTTCTTG	ACCTCGTATTAATAAAATTTGCGATG	AT(2*11)	24	SI	60	Polimorfismo	2	162-176	11
PM0532	TTAAAACACCCCTCTTAAGCCACA	GTCAAGATCGGGAAGATCAAATG	TA(2*12)	20	NO	-	-	-	-	-
PM0534	TTAGCTCATCAACTAATAAAATTCGG	CAAAAAGAATACGATTCGGTAAGTT	AT(2*13)	27	NO	-	-	-	-	-
PM0536	TTACAGTGTTAGAGTAGGTGCCCCG	TTTAATATTAGCAAAACCTTTTCAATCG	TAT(3*8)	24	NO	-	-	-	-	-
PM0538	GGTTTAGCGACATATACAAAGAATGC	TGTTTGATTGTGAGTGTGTGAAGG	TA(2*12)	20	SI	50	Monomórfico	1	-	-
PM0541	TATGCCCTCTCCTTCTCTCCTT	ATACCCAAAATCCTCACCAAGAAA	TTC(3*12)	52	SI	60	Polimorfismo	3	177-194	12